

TESIS

PENGARUH TERAPI N-ASETIL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTISIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS

**Disusun untuk kualifikasi mencapai derajat Magister Kesehatan
Pada Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Minat Utama Ilmu Biomedik**



Oleh:

**Warigit Dri Atmoko
S 961108007**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS SEBELAS MARET SURAKARTA
2016**

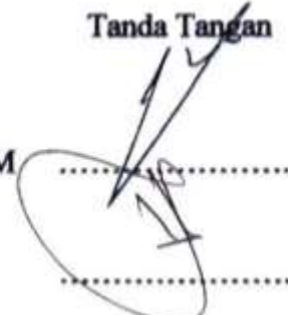
TESIS

PENGARUH TERAPI N-ASETIL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTITIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS

Oleh :

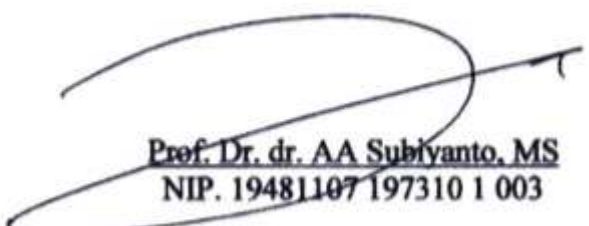
Warigit Dri Atmoko
S 961108007

Telah disetujui oleh Tim Pembimbing

Komisi Pembimbing	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Pembimbing I	Prof. Dr. dr. HM Bambang Purwanto, SpPD-KGH, FINASIM NIP. 19480719 197609 1 001		3 / 10 / 16
Pembimbing II	Dr. dr. Sugiarto SpPD-KEMD, FINASIM NIP. 19620522 198901 1 001		5 / 10 / 16

Telah dinyatakan memenuhi syarat
pada tanggal, Oktober 2016

Kepala Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Program Pascasarjana UNS


Prof. Dr. dr. AA Subiyanto, MS
NIP. 19481107 197310 1 003

TESIS

PENGARUH TERAPI N-ASETIL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTITIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS

Disusun untuk kualifikasi mencapai derajat Magister Kesehatan
Pada Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Minat Utama Ilmu Biomedik

Oleh :

Warigit Dri Atmoko
S 961108007

Tim Penguji :

Jabatan	Nama
Ketua	Dr. Hari Wujoso, dr. SpF, M.M NIP. 19621022 199503 1 001
Sekretaris	Dr. Sugiarto, dr. SpPD-KEMD, FINASIM NIP. 19620522 198901 1 001
Penguji	Prof. Dr. J. Priyambodo, dr. SpMK, M.S NIP. 19430918 197609 1 001 Prof. Dr. HM. Bambang P, dr. SpPD-KGH, FINASIM NIP. 19480719 197609 1 001

Tanda Tangan

Mengetahui,

Direktur Program Pascasarjana

Kepala Program Studi
Magister Kedokteran Keluarga



Prof. Dr. M Furdon Hidayatullah, M.Pd
NIP. 19600727 198702 1 001

Prof. Dr. AA Subiyanto, dr. M.S
NIP. 19481107-197310 1 003

PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI

Saya menyatakan dengan sebesar-besarnya bahwa:

1. Tesis yang berjudul **“Pengaruh Terapi N-Asetilsistein Terhadap Interleukin 17 Dan Fibrosis Interstisial Pada Mencit Nefritis Lupus”** ini adalah karya penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dengan acuan yang disebutkan sumbernya, baik dalam naskah karangan dan daftar pustaka. Apabila ternyata didalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi, baik tesis beserta gelar Magister saya dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi Tesis pada jurnal atau forum ilmiah harus menyertakan tim promotor sebagai *author* dan PPs UNS sebagai institusinya. Apabila saya melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka saya bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, Oktober 2016



Warigit Dri Atmoko
Warigit Dri Atmoko

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillahirabbil'alamin penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan kasih sayang, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan tesis yang berjudul **PENGARUH TERAPI N-ASETIL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTISIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS** dapat terselesaikan. Penelitian ini disusun untuk kualifikasi mencapai derajat Magister Kesehatan pada Program Studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Ilmu Biomedik Pascasarjana Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang tinggi kepada:

1. **Prof. Dr. Ravik Karsidi, M.S**, selaku Rektor Universitas Sebelas Maret yang telah memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan di Universitas Sebelas Maret.
2. **Prof. Dr. M. Furqon Hidayatullah, M.Pd**, sebagai Direktur Program Pasca Sarjana UNS beserta staf atas kebijakannya yang telah mendukung dalam penulisan penelitian tesis ini.
3. **Prof. Dr. AA. Subiyanto, dr. MS**, sebagai Kepala Program Studi Magister Kedokteran Keluarga yang telah memberikan dorongan dan arahan kepada penulis untuk pelaksanaan dan penulisan tesis ini.
4. **Prof. Dr. Hartono, dr. M.Si**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret yang memberikan penulis kesempatan untuk menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran UNS.
5. **Endang Agustinar, dr.M.Kes**, sebagai Direktur RSUD Dr. Moewardi beserta seluruh jajaran staf direksi yang telah berkenan dan mengijinkan untuk menjalani program pendidikan PPDS Ilmu Penyakit Dalam.
6. **Prof. Dr. HM. Bambang Purwanto, dr. SpPD-KGH, FINASIM**, selaku Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK UNS/RSUD Dr Moewardi dan Pembimbing I yang telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam

penyusunan tesis ini, serta memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.

7. **Dr. H. Sugiarto, dr. SpPD-KEMD, FINASIM**, selaku Kepala Program Studi PPDS I Ilmu Penyakit Dalam dan Pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam penyusunan tesis ini dan memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan program PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.
8. **Diding Heri P, dr. SpPD, M.Si, M.kes**, selaku pembimbing statistik penelitian, yang dengan kesabaran telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam penyusunan tesis.
9. **Dr. Hari Wujoso, dr. SpF, M.M**, sebagai Tim Penguji Magister Kedokteran Keluarga yang telah memberikan dorongan dan arahan kepada penulis untuk pelaksanaan dan penulisan tesis ini.
10. **Prof. Dr. J. Priyambodo, dr. SpMK, M.S**, sebagai Tim Penguji Magister Kedokteran Keluarga yang telah memberikan dorongan, masukan dan kritik kepada penulis untuk pelaksanaan dan penulisan tesis ini.
11. Seluruh Staf Pengajar Ilmu Penyakit Dalam FK UNS/RSUD Dr Moewardi Surakarta, Prof. Dr. H A Guntur Hermawan dr. SpPD KPTI FINASIM (Alm), Prof. Dr. Bambang Purwanto, dr. SpPD KGH FINASIM, Prof. Dr. Zainal Arifin Adnan, dr. SpPD KR FINASIM, Prof. Dr. Djoko Hardiman, dr. SpPD KEMD FINASIM, Suradi Maryono, dr. SpPD KHOM FINASIM, Sumarmi Soewoto dr. SpPD KGer FINASIM, Tatar Sumandjar, dr. SpPD KPTI FINASIM, Tantoro Harmono, dr. SpPD KGEH FINASIM, Tri Yuli Pramana, dr. SpPD KGEH FINASIM, P Kusnanto, dr. SpPD KGEH FINASIM, Dr. Sugiarto, dr. SpPD KEMD FINASIM, Supriyanto Kartodarsono, dr. SpPD KEMD FINASIM, Supriyanto Muktiatmojo, dr. SpPD FINASIM, Dhani Redhono, dr. SpPD KPTI FINASIM, Wachid Putranto, dr. SpPD KGH FINASIM, Arifin, dr. SpPD KIC FINASIM, Fatichati Budiningsih, dr. SpPD KGer FINASIM, Agung Susanto, dr. SpPD, Arief Nurudin, dr. SpPD, Agus Joko Susanto, dr. SpPD, Yulyani Werdiningsih, dr. SpPD, Marwanta, dr. SpPD, Aritantri, dr. SpPD, Bayu Basuki W, SpPD MKes, R. Satriyo, dr. SpPD

MKes, Evi Nurhayatun, dr. SpPD MKes, Eva Nia M, dr. SpPD MKes, Yudhi Hajianto N, dr. SpPD MKes, Diding Heri P, dr. MSi, SpPD MKes, SpPD MKes, Ratih Tri KD, dr. SpPD, Agus Jati SpPD, yang telah memberi dorongan dan bimbingan dalam segala bentuk sehingga penulis bisa menyelesaikan penyusunan tesis.

12. **Segenap Dosen Program Magister Kedokteran Keluarga** Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah membekali ilmu pengetahuan yang sangat berarti bagi peneliti.
 13. **Drg. H. Soewardo Hatmosumarto, Ibu Hj. Mieke Utami, Bpk. H. Tri Susilo, SE, Ibu Hj. Ria Kuspadmini**, Orang tua dan Mertua, yang telah memberikan dorongan baik moril maupun materiil dalam menjalani pendidikan PPDS I Penyakit Dalam.
 14. **Istriku tercinta Evin Kurnia Triasanti, SKg, anakku tercinta M.Rakan Arsyad Trihatmo, M. Rafif Alkhalifi Trihatmo dan inshaAlloh anakku di dalam kandungan** yang selalu memberikan dukungan doa, semangat, keceriaan dan inspirasi dalam menjalani pendidikan PPDS I bagian Ilmu Penyakit Dalam.
 15. **Seluruh Teman Sejawat Residen Penyakit Dalam** yang telah memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis baik dalam penelitian ini maupun selama menjalani pendidikan.
 16. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah membantu baik dalam menjalani pendidikan maupun dalam penelitian ini.
- Penyusun menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, untuk itu penyusun mohon maaf dan sangat mengharapkan saran serta kritik yang membangun dalam rangka perbaikan penulisan penelitian tesis ini.

Surakarta, Oktober 2016
Penyusun

Warigit Dri Atmoko

Warigit Dri Atmoko. 2016. Pengaruh Terapi N-Asetilsistein Terhadap Ekspresi Interleukin-17 dan Fibrosis Interstisial Pada Mencit Nefritis Lupus. TESIS. Pembimbing I: Prof.Dr. dr. HM Bambang Purwanto, Sp.PD-KGH, FINASIM, Pembimbing II: Dr. dr. Sugiarto, Sp.PD-KEMD, FINASIM. Program Studi Kedokteran Keluarga, Program Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

ABSTRAK

Latar Belakang

Lupus nefritis (LN) terkait dengan penebalan membran basal glomerulus. Pengendapan kompleks imun memicu kaskade respon inflamasi disertai aktivasi *reactive oxygen species* (ROS), akhirnya terjadi fibrosis yang mendorong terjadinya kerusakan ginjal. Interleukin-17 adalah sitokin pro-inflamasi kuat yang dihasilkan oleh limfosit T teraktivasi. IL-17 dikaitkan dengan kerusakan organ imun dalam beberapa penyakit autoimun, kadarnya meningkat dan berkorelasi dengan aktivitas SLE. N-Asetil Sistein (NAS) merupakan suatu senyawa dengan efek antioksidan dan antiinflamasi, sehingga mampu mencegah terjadinya peningkatan ekspresi IL-17 dan fibrosis interstisial.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh NAS terhadap ekspresi IL-17 dan fibrosis interstisial ginjal pada mencit lupus nefritis.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, dengan sampel 24 ekor mencit Balb/C betina yang dibagi menjadi kelompok kontrol, LN, dan LN+NAS. Untuk membuat model LN, hewan coba diberikan injeksi 0,5 ml pristan intraperitoneal dosis tunggal. NAS diberikan secara peroral dengan dosis 4,7mg/hari (setara dengan dosis manusia 1.800 mg) selama delapan minggu. Mencit kontrol tidak diinokulasi selama penelitian. Ekspresi IL-17 dihitung dari 100 sel netrofil yang immunoreaktif dengan teknik imunohistokimia dan fibrosis interstisial dengan teknik histopatologi. Analisis data menggunakan *analysis of variance* (Anova) dan untuk menentukan perbedaan kemaknaan digunakan $p < 0,05$.

Hasil Penelitian

Pemberian N-Asetilsistein menurunkan ekspresi IL-17 ($23,8 \pm 14,1$ vs $10,6 \pm 6,8$ per 100 sel netrofil immunoreaktif; $p = 0,042$) dan menurunkan fibrosis interstisial ($22,3 \pm 5,7$ vs $15,5 \pm 5,4$; $p = 0,030$) dibandingkan kelompok LN.

Kesimpulan

Pemberian N-Asetilsistein secara bermakna menurunkan ekspresi IL-17 dan fibrosis interstisial pada mencit LN.

Kata kunci: fibrosis, IL-17, lupus nefritis, pristan

Warigit Dri Atmoko. 2016. Analysis of Effect of N-acetylcysteine on Interleukin-17 expression and Interstitial Fibrosis in Mice of nephritis lupus. THESIS. Supervisor I: Prof. Dr. dr. HM Bambang Purwanto, Sp.PD-KGH, FINASIM, Supervisor II: Dr. dr. Sugiarto, Sp.PD-KEMD, FINASIM. Program Study of Medical Family, Post-graduate Program of Sebelas Maret University Surakarta.

ABSTRACT

Background

Lupus nephritis (LN) is associated with thickening of the glomerular basement membrane. The deposition of immune complexes triggers a cascade of inflammatory response with activation of reactive oxygen species (ROS), it finally happened fibrosis leads to a kidney damage. Interleukin-17 (IL-17) is a potent pro-inflammatory cytokine that is produced by activated T lymphocytes. IL-17 has been linked to the instigation of immune-mediated organ damage in the context of several autoimmune diseases, the levels are increased and correlate with SLE activity. N-Acetyl Cysteine (NAS) is a compound with antioxidant and anti-inflammatory effects, so as to prevent an increase in expression of IL-17 and interstitial fibrosis.

Objectives

This study aimed to analyze the effects of NAS on the expression of IL-17 and interstitial fibrosis in mice of lupus nephritis.

Methods

This study is an experimental research laboratory, with a sample of 24 females Balb/C mice were divided into a control group, LN and LN+NAS. To create a model LN, experimental animals given intraperitoneal injection of 0.5 ml Pristan single dose. NAS administered orally at a dose of 4.7 mg/day (equivalent to a human dose of 1,800 mg) for eight weeks. Control mice not inoculated during the study. Expression of IL-17 was calculated from 100 neutrophil cells immunoreactive with immunohistochemical and interstitial fibrosis with histopathological techniques. One way analysis of variance (Anova) for IL-17 expression and interstitial fibrosis, and $p < 0.05$ were used to determine the significant differences.

Results

The provision of NAS decreased the expression of IL-17 (23.8 ± 14.1 vs 10.6 ± 6.8 per 100 neutrophils immunoreactive cells; $p = 0.042$) and interstitial fibrosis (22.3 ± 5.7 vs 15.5 ± 5.4 ; $p = 0.030$) compared to LN group respectively.

Conclusions

The provision of NAS significantly decrease the expression of IL-17 and interstitial fibrosis in mice LN.

Key words: fibrosis, IL-17, Lupus nephritis, pristane

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	5
C. Tujuan Penelitian.....	6
D. Manfaat Penelitian.....	6
BAB II LANDASAN TEORI	8
A. Tinjauan Pustaka	7
1. Anatomi dan Histologi Sistem Urinaria	7
2. Nefritis Lupus	11
1.1.Patogenesis lupus nefritis	12
1.2.Terapi lupus nefritis	15
3. N-Asetil Sistein.....	16
4. Peran Fibrosis interstisial pada nefritis lupus	18
5. Peran IL-17 pada nefritis lupus.....	22
B. Penelitian Relevan	25
C. Kerangka Pikir.....	26
1. Kerangka Teori	26
2. Kerangka Konseptual.....	30
D. Hipotesis Penelitian	30

BAB III METODE PENELITIAN	31
A. Jenis Penelitian.....	31
B. Tempat dan Waktu Penelitian	32
C. Subyek Penelitian dan Besar Sampel	32
D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	34
1. Variabel Penelitian.....	34
2. Definisi Oprasional	34
E. Teknik Pengumpulan Data	37
F. Teknik Pendeteksian dan Pengukuran Data.....	38
1. Teknik Pembuatan Preparat Histologis Ginjal	38
2. Teknik Pewarnaan Imunohistokimia IL-17	39
G. Analisis Data	41
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	42
A. Hasil Penelitian.....	42
1. Proses Analisis Penelitian.....	42
2. Deskripsi Variabel Penelitian	44
3. Analisis Pengaruh NAS terhadap Ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosis interstisialpada Mencit yang Terinduksi Pristan.....	46
B. Pembahasan	52
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	60
A. Kesimpulan	60
B. Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Anatomi ginjal (Eroschenko, 2000)	9
Gambar 2.2.	Nefron (Eroschenko, 2000).....	
Gambar 2.3.	Penampang Glomerulus (Robbins dan Cotran, 2005).....	10
Gambar 2.4.	Histologi korteks, medulla, piramid dan papila ginjal (Eroschenko, 2000)	11
Gambar 2.5.	Peran sitokin dalam patogenesis lupus nefritis (Iwata dkk., 2011)	15
Gambar 2.6.	Struktur molekul N-Asetil Sistein (Heloisa dkk., 2005)	17
Gambar 2.7.	Farmakodinamik N-Asetil Sistein (Nolin dkk., 2010).....	19
Gambar 2.8.	Mekanisme fibrosis (Robbins dan Cotran, 2005)	21
Gambar 2.9.	Jalur crosstalk TGF- β /smads pada fibrosis dan inflamasi ginjal (Lan, 2011).....	22
Gambar 2.10.	Inflamasi merupakan faktor kunci dalam patogenesis lupus (Gottschalk dkk., 2015)	25
Gambar 2.11.	Kerangka Teori	27
Gambar 2.12.	Kerangka konseptual	31
Gambar 3.1.	Bagan rancangan penelitian	32
Gambar 3.2.	Kerangka operasional Pristan dan N-asetil sistein	37
Gambar 5.1.	Perbandingan Nilai Rata-rata Ekspresi IL 17 (per 100 sel netrofil) antar Kelompok Sampel	45
Gambar 5.2.	Perbandingan Rata-rata tingkat fibrosis interstisial antar Kelompok Sampel.....	46
Gambar 5.3.	Perbandingan gambaran protein IL 17 yang diekspresikan sel netrofil masing-masing kelompok.	48
Gambar 5.4.	Perbandingan gambaran tingkat fibrosis interstisial. A: ginjal normal ; B: fibrosis dan inflamasi interstisial	50

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1.	Deskripsi dan Uji Normalitas ekspresi IL 17	44
Tabel 5.2.	Deskripsi dan Uji Normalitas tingkat fibrosis interstisial	45
Tabel 5.3.	Perbedaan rata-rata ekspresi IL 17 per 100 sel netrofil dalam kelompok sampel	47
Tabel 5.4.	Perbedaan rata-rata ekspresi IL 17 per 100 sel netrofil antar kelompok sampel.....	48
Tabel 5.5.	Perbedaan rata-rata tingkat fibrosis interstisial menurut kelompok sampel.....	49
Tabel 5.6.	Perbedaan rata-rata tingkat fibrosis interstisial antar kelompok sampel.....	51

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Ethical Clearance.....	68
Lampiran 2.	Analisis Statistik IL 17	69
Lampiran 3.	Analisis Statistik fibrosis interstisial	70

DAFTAR SINGKATAN

BMP-7	: bone morphogenic protein-7
DAMP	: damaged associated molecular pattern
DNA	: deoxyribonucleic acid
ECM	: extra cellular matrix
ICAM	: intercellular adhesion molecule
IL	: interleukin
I κ B	: Inhibitor kappa beta
LN	: lupus nefritis
LES	: lupus eritematous sistemic
MMP-9	: matrix metalloproteinase 9
NF- κ B	: nuclear factor kappa beta
NAS	: n-asetil sistein
NCF	: neutrophil chemotactic factor
PMN	: polimorfonuklear
ROS	: reactive oxygen species
SLEDAI	: systemic lupus erythematosus disease activity index
TGF- β 1	: tumor growth factor beta 1
Th	: T helper
TLRs	: toll like receptors
TNF- α	: tumor necrosis factor alfa

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan prototipe penyakit inflamasi autoimun kronis yang dicirikan oleh hilangnya toleransi terhadap antigen self, produksi autoantibodi poliklonal, pembentukan kompleks imun, dan deposisi di bagian tubuh yang berbeda, mengarah ke peradangan yang merugikan dan cedera multi organ (Lech dan Anders, 2013). Di antara spektrum yang luas dari komplikasi SLE, salah satu yang paling umum dan parah adalah lupus nefritis. Lupus nefritis terjadi pada 50% -70% dari pasien LES dalam lima tahun pertama diagnosis. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan ginjal permanen dan penyakit ginjal kronis. Keterlibatan ginjal di awal perjalanan dari LES menjadi prediktor utama prognosis buruk (Maroz dan Segal, 2013).

Keterlibatan ginjal pada LES merupakan manifestasi penyakit yang umum dijumpai. Inflamasi ginjal adalah salah satu manifestasi yang paling parah dari SLE dan ditandai oleh deposisi autoantibodi dan komplemen, produksi sitokin/kemokin, aktivasi dan perekrutan sel-sel inflamasi, dan kerusakan mikrovaskuler dan parenkim di ginjal (Maroz dan Segal, 2013; Lech dan Anders, 2013). Pengendapan kompleks imun memicu kaskade respon inflamasi disertai aktivasi *reactive oxygen species* (ROS), yang memainkan peran penting dalam terjadinya injuri glomerulus akut dan kronis pada pasien nefritis lupus. Nefritis lupus tampak jelas secara histologis pada kebanyakan pasien

dengan LES, bahkan mereka yang tidak menunjukkan manifestasi klinis penyakit ginjal (Borchers dkk., 2012).

Prevalensi penyakit ginjal pada pasien LES bervariasi antara 31-65%. Berdasarkan data dari Asia, keterlibatan renal berkisar antara 6-100% secara keseluruhan (Isbagio dkk., 2006), sedangkan hasil penelitian di RS dr Moewardi Surakarta gangguan fungsi ginjal ditemukan pada 68% penderita LES dan kelainan ini merupakan penyebab kematian yang paling banyak (Guntur, 2006).

Predisposisi genetik, sitokin proinflamasi dan anti-inflamasi, autoantibodi, kelainan limfosit serta defek pada sistem komplemen semua memiliki peran dalam pengembangan LES. Di antara faktor-faktor ini, kontribusi autoantibodi dan penyimpangan limfosit sangat berperan dalam patogenesis penyakit ginjal pada SLE. Terdapat hubungan erat antara produksi autoantibodi dan kelainan pada subpopulasi limfosit. Selain itu, perubahan autoantibodi dan subset limfosit dapat mencerminkan aktivitas penyakit lupus nefritis dan menjadi target potensial terapi immunosupresif. Oleh karena itu, pemahaman autoantibodi nefritogenik dan subset limfosit akan membantu mengembangkan strategi baru untuk pemantauan aktivitas penyakit dan pengobatan lupus nefritis (Yap dan La, 2015).

Limfosit B memiliki efek pleiotropik dalam pengembangan lupus nefritis, termasuk pembentukan autoantibodi, sekresi sitokin proinflamasi dan anti-inflamasi, presentasi auto-antigen dan infiltrasi langsung ke ginjal (Yap dan La, 2015; Sterner dkk., 2014; Espeli dkk., 2011).

Sel Th17 berperan dalam patogenesis berbagai penyakit autoimun termasuk LES. Sel Th17 merupakan subset sel T helper yang dicirikan dengan produksi

sitokin IL-17. Sel Th17 terlibat dalam menyebabkan peradangan dan cedera jaringan pada gangguan autoimun. Pada lupus nefritis didapatkan adanya infiltrasi dari sel Th17 pada ginjal yang signifikan disertai produksi IL-17. Ekspresi reseptor IL-17 dan IL-23 pada limfosit meningkat pada lupus nefritis. Produksi IL-17 dirangsang oleh IL-23 (Yap dan La, 2015; Sterner dkk., 2014; Peliçari dkk., 2015). Jumlah sel Th17 berkorelasi dengan skor aktivitas penyakit (*systemic lupus erythematosus disease activity index* (SLEDAI)) dan perubahan histopatologi di ginjal (Chen dkk., 2012). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian dari pasien lupus nefritis memperlihatkan fenotipe Th17 yang dapat mempengaruhi respons terhadap pengobatan dan dapat dievaluasi sebagai biomarker untuk respons terapi yang buruk (Schmidt dkk., 2015; Summers dkk., 2014).

Injeksi pristan akan mengaktivasi NfκB dalam makrofag untuk mensekresikan dan mengekspresikan sitokin-sitokin proinflamasi (IL-6 dan TNF-α) serta faktor pertumbuhan (TGF-β1). IL-6 dan TNF-α akan memicu sumsum tulang sehingga terjadi leukositosis. Leukositosis akan memperbanyak sel-sel polimorfonuklear (PMN) maupun monosit untuk bergerak menuju tempat lesi pada ginjal. IL-8 sebagai *neutrophil chemotatic factor* (NCF), akan menarik PMN dalam sirkulasi mendekat permukaan endotel pembuluh darah ginjal. TGF-β1 merupakan sitokin yang paling dominan berperan dalam menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis maupun interstitial fibrosis. TGF-β1 akan merangsang reseptor membran sel fibroblast sehingga mengekspresikan kolagen tipe-I akibatnya terjadi interstitial fibrosis. Selain itu, TGF-β1 juga akan merangsang reseptor membran sel

mesangial sehingga mengekspresikan kolagen tipe-IV, yang mengakibatkan terjadinya glomerulosklerosis (Robbins dan Cotran, 2005; Purwanto, 2010; Qu dkk., 2014; Mohamed dkk., 2013; Ranganathan dkk., 2013).

Rangsangan endotel oleh TNF α akan menyebabkan endotel meng-ekspresikan e-selektin yang diperlukan untuk mengikat PMN. PMN kemudian akan mengekspresikan MMP-9. MMP-9 selanjutnya mendegradasi kolagen yang diekspresikan oleh sel fibroblas maupun mesangial. Dalam keadaan normal sesuai dengan hukum homeostasis, terjadi keseimbangan pengaruh TGF- β 1 dan MMP-9. TGF- β 1 juga menghambat ekspresi MMP-9 yang diekspresikan oleh PMN. Pada penelitian ini injeksi pristin diharapkan akan menyebabkan TGF- β 1 lebih dominan daripada MMP-9, sehingga terjadi interstitial fibrosis maupun glomerulosklerosis. IL-1 β akan merangsang endotel untuk mengekspresikan ICAM, selanjutnya ICAM akan mengikat monosit kemudian monosit akan masuk ke jaringan dan akan berubah menjadi makrofag. Makrofag yang bertambah banyak akan menyebabkan meningkatnya proses ekspresi sitokin yang berakibat pada bertambah beratnya fibrosis (Gameson dan Reeves, 2007; Purwanto, 2010).

Prinsip dasar tujuan pengobatan lupus nefritis adalah menekan reaksi inflamasi lupus, memperbaiki fungsi ginjal atau setidaknya mempertahankan fungsi ginjal agar tidak menjadi penyakit ginjal stadium akhir dan menurunkan risiko penyakit ginjal kronis dan aterosklerosis dan konsekuensi metabolik. (Ward, 2014). Medikamentosa berupa kortikosteroid dan agen imunosupresif. Dialisis dapat dilakukan untuk mengontrol gejala gagal ginjal. Transplantasi ginjal

juga direkomendasikan (pasien dengan lupus yang aktif tidak boleh dilakukan transplantasi ginjal) (McPhee dan Papadakis, 2011).

Obat-obatan yang memiliki efek seperti ROS *scavenging*, dan penghambatan jalur NF- κ B memiliki efek perlindungan terhadap progresifitas nefritis lupus. Jalur NF- κ B sangat penting dalam perkembangan lupus, jalur ini mengontrol ekspresi sejumlah gen proinflamasi, seperti iNOS maupun IL-17 yang kadarnya tinggi pada lupus dan berkorelasi dengan keparahan penyakitnya (Jiang dkk., 2014; Yap dan La, 2015). N-Asetil Sistein (NAS) merupakan suatu senyawa yang mengandung tiol dengan efek antioksidan dan antiinflamasi. Efek antioksidan N-Asetil Sistein dapat terjadi secara langsung melalui interaksi dengan ROS elektrofilik maupun sebagai prekursor glutathione, suatu antioksidan yang dapat melindungi sel dari stres oksidatif (De Backer dkk., 2013). Dengan demikian, suplemen antioksidan (NAS) pada pengobatan lupus nefritis mungkin dapat mencegah/mengurangi efek kerusakan ginjal serta keparahan lupus nefritis.

B. Rumusan Masalah

1. Adakah pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap ekspresi IL-17 glomerulus pada mencit model nefritis lupus?
2. Adakah pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap derajat fibrosis interstisial ginjal pada mencit model nefritis lupus?

C. Tujuan Penelitian :

1. Tujuan umum :

Membuktikan, mengetahui dan membandingkan pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap ekspresi IL-17 glomerulus dan derajat fibrosis interstisial ginjal pada nefritis lupus.

2. Tujuan Khusus :

- a. Menganalisis pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap penurunan ekspresi IL-17 glomerulus pada nefritis lupus.
- b. Menganalisis pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap penurunan derajat fibrosis interstisial pada nefritis lupus.

D. Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis

- a. Memberikan bukti ilmiah mengenai pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap penurunan ekspresi IL-17 glomerulus pada nefritis lupus.
- b. Memberikan bukti ilmiah mengenai pengaruh pemberian N-asetilsistein terhadap penurunan derajat fibrosis interstisial pada nefritis lupus.

2. Manfaat terapan

- a. Efek N-asetilsistein pada peningkatan *outcome* pasien nefritis lupus.
- b. Menjadikan N-asetilsistein sebagai salah satu terapi tambahan atau suplementasi pada pasien nefritis lupus untuk menurunkan risiko morbiditas dan mortalitas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Kajian Teori

1. Anatomi dan Histologi Sistem Urinaria

Sistem urinaria terdiri atas dua ginjal dan dua ureter bermuara pada satu vesika urinaria kemudian keluar dengan satu uretra. Organ ginjal berbentuk seperti kacang letaknya retroperitoneal dinding posterior cavum abdomen. Di atas setiap ginjal terdapat kelenjar adrenal yang terbenam dalam jaringan ikat. Tepi medial ginjal yang cekung adalah hilus, terdapat arteri (renalis), vena renalis dan pelvis renalis berbentuk corong. Irisan sagital ginjal, bagian luar disebut korteks, bagian dalam disebut medula, medula terdiri atas piramid renal berbentuk kerucut. Dasar setiap piramid menyatu dengan korteks, apeks bulat setiap piramid disebut papila renalis, dililingi kaliks minor berbentuk corong. Kaliks minor bergabung membentuk kaliks mayor, dan akhirnya bergabung membentuk pelvis renalis. Setiap pelvis renalis keluar sebagai ureter (Guyton dan Hall, 1995 ; Eroschenko, 2000).

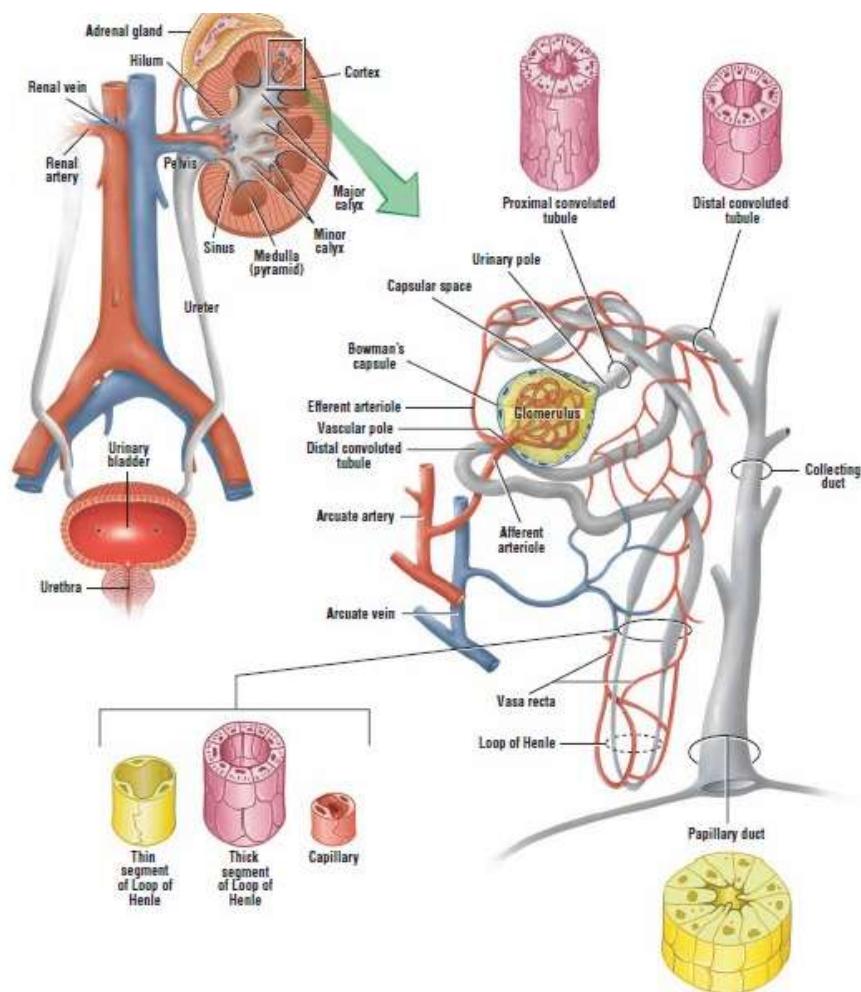
Nefron merupakan unit fungsional terkecil ginjal. Setiap ginjal terdapat kurang lebih satu juta nefron (Guyton dan Hall, 1995; Eroschenko, 2000).

Tiap nefron terdiri dari :

- a. Korpuskula renal dan tubuli renal
 - a) Korpuskula renal terdiri atas glomerulus merupakan anyaman kapiler dan dibungkus oleh kapsul glomerular (Bowman)

- b) Tubuli renal terdiri atas : Tubulus kontortus proksimal, Ansa henle dan Tubulus kontortus distal.

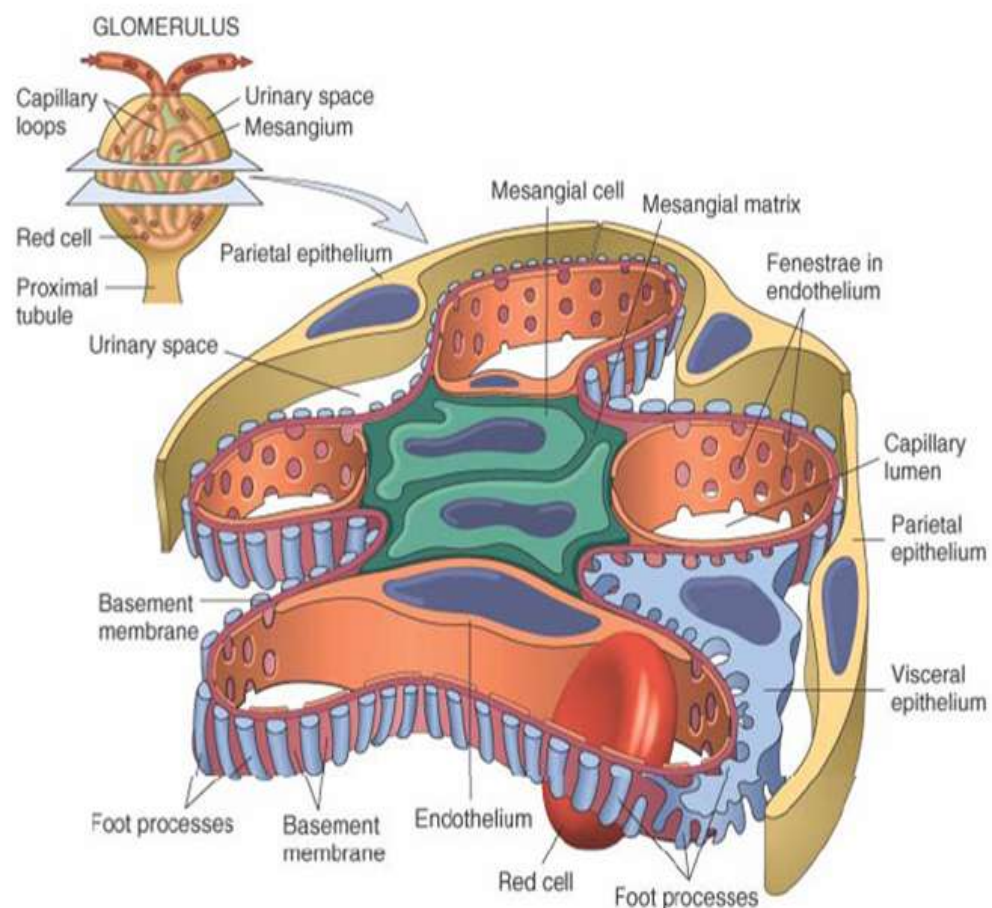
Glomerulus terletak di korteks kemudian menyambung tubulus kontortus proksimal masih berada di korteks, selanjutnya menjadi ansa henle terletak di Medula, menyambung tubulus kontortus distal terletak di korteks kemudian menyambung ke tubulus koligens (Guyton dan Hall, 1995; Eroschenko, 2000).



Gambar 2.1. Anatomi ginjal.

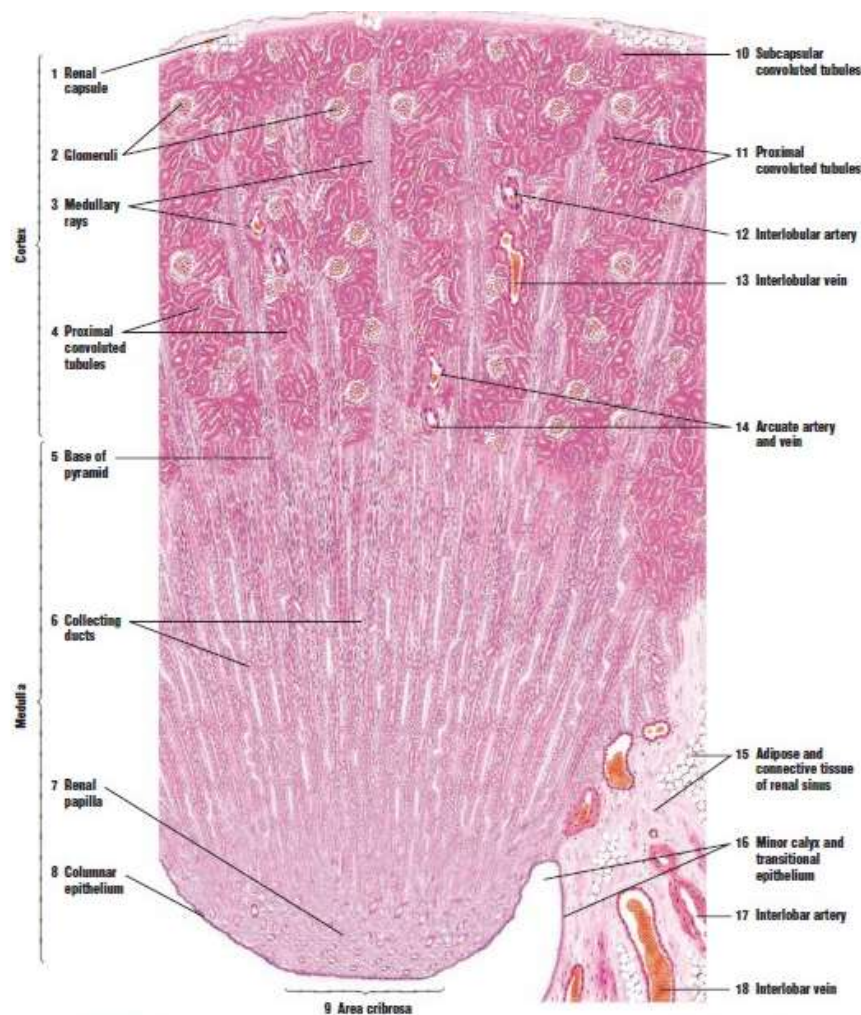
Potongan sagital ginjal menunjukkan korteks dan medula, dengan pembuluh darah dan duktus ekskretorius, termasuk pelvis dan ureter, serta perbandingan histologi pembuluh darah, perbedaan tubulus nefron dan duktus kolektifus (Eroschenko, 2000)

Bila glomerulus dipotong melintang akan terlihat gambaran endotel pembuluh darah dengan *Fenestrae* sebagai lubang untuk filtrasi, sel mesangial terletak di bagian sentral, sel visceral yang berbatasan langsung dengan endotel dibatasi oleh membran basalis. Bagian tepi dari sel visceral membentuk kaki podosit. *Kaki podosit* bersama sama dengan dinding endotel membentuk *Fenestrasi*. Sebelah luar dari sel visceral terdapat parietal. Antara sel visceral dan sel parietal merupakan suatu ruangan untuk memproses terjadinya urin yang akan bermuara pada lumen tubulus proksimal (Robbins dan Cotran, 2005).

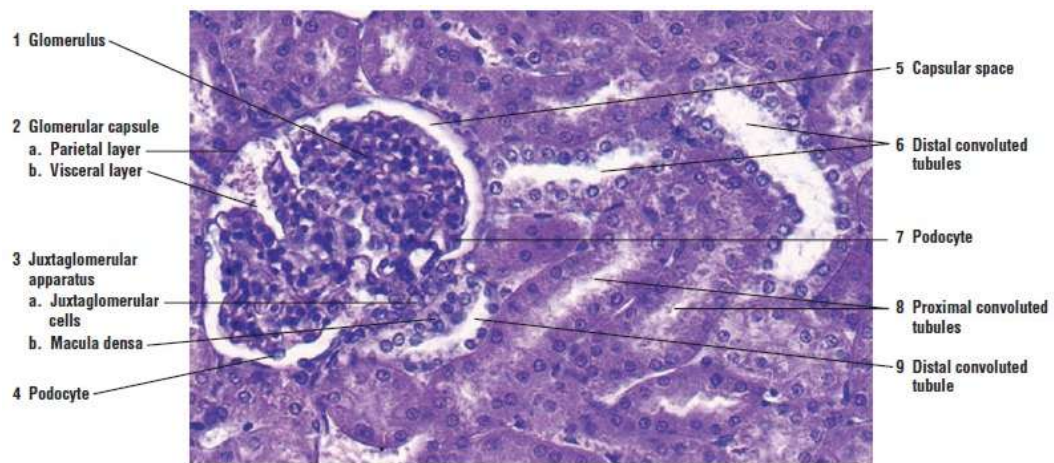


Gambar 2.2. Penampang Glomerulus (Robbins dan Cotran, 2005)

Gambaran histologi pada ginjal normal baik bagian korteks maupun medula. Bagian korteks terdiri dari glomerulus, tubulus proksimal, tubulus distal sedangkan bagian medula terdiri dari ansa henle dan tubulus koligens yang akan bermuara ke dalam pelvis ginjal. Pembuluh darah yang masuk ke dalam glomerulus disebut vasa aferen kemudian bercabang cabang membentuk kapiler kemudian bersatu lagi membentuk vasa eferen akan mengelilingi tubulus proksimal, ansa Henle, tubulus distal (Guyton dan Hall, 1995; Eroschenko, 2000).



Gambar 2.3. Histologi korteks, medulla, piramid dan papila ginjal
(Eroschenko, 2000)



Gambar 2.4. Histologi kortek ginjal (Eroschenko, 2000)

2. Nefritis Lupus

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan prototipe penyakit inflamasi autoimun kronis yang dicirikan oleh hilangnya toleransi terhadap antigen self, produksi autoantibodi poliklonal, pembentukan kompleks imun, dan deposisi di bagian tubuh yang berbeda, mengarah ke peradangan yang merugikan dan cedera multi organ (Lech dan Anders, 2013). LES adalah penyakit autoimun yang heterogen, mempengaruhi 1 dari 2.000 individu di Amerika Serikat diantaranya 90% adalah kaum perempuan. Hal ini ditandai oleh produksi autoantibodi terhadap antigen nukleus dan mempengaruhi beberapa organ dan jaringan (Rahman dan Isenberg, 2008). Di Amerika, prevalensi SLE adalah 1 kasus per 2.000 penduduk pada populasi umum. Karena kesulitan diagnosis dan kemungkinan banyak kasus tidak terdeteksi, sebagian besar peneliti menyarankan bahwa prevalensi mungkin lebih mendekati ke 1 kasus per 500-1.000 populasi (Askasane dkk., 2012). Data prevalensi SLE di Indonesia sampai saat ini belum

ada. Jumlah penderita SLE di Indonesia menurut Yayasan Lupus Indonesia (YLI) sampai dengan tahun 2005 diperkirakan mencapai 5.000 orang.

Nefritis lupus merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pasien LES. Lupus nefritis terjadi pada 50% -70% dari pasien LES dalam lima tahun pertama diagnosis. Hal ini dapat menyebabkan kerusakan ginjal permanen dan penyakit ginjal kronis. Keterlibatan ginjal di awal perjalanan dari LES menjadi prediktor utama prognosis buruk (Appel dkk., 2007; Maroz dan Segal, 2013). Nefritis lupus tampak jelas secara histologis pada kebanyakan pasien dengan SLE, bahkan mereka yang tidak menunjukkan manifestasi klinis penyakit ginjal. Sehingga pengenalan dan terapi dengan segera penyakit ginjal sangat penting, karena respon awal terapi berkaitan erat dengan *outcome* yang baik (Bertsias dkk., 2008).

2.1. Patogenesis lupus nefritis

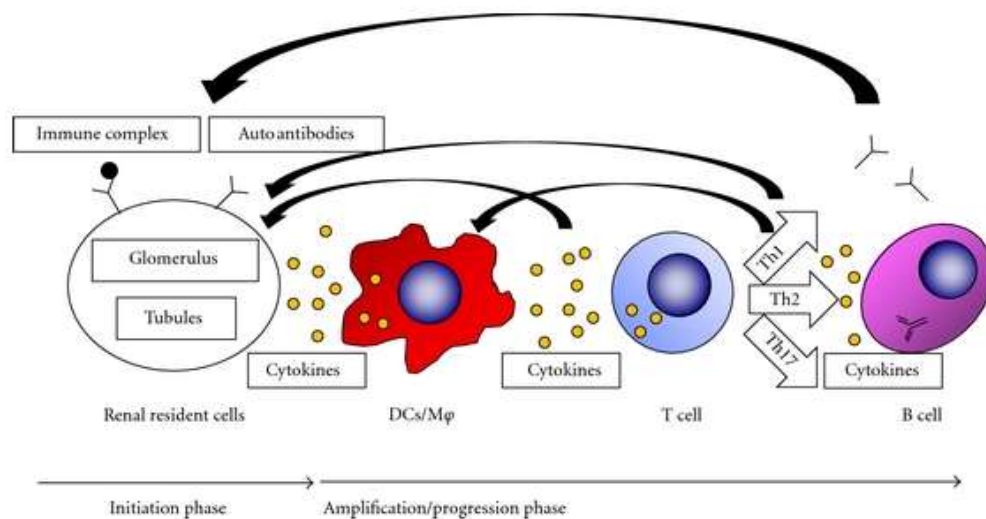
Terjadinya lupus nefritis diprakarsai oleh adanya deposisi kompleks imun di glomerulus yang memicu kaskade kejadian inflamasi, perekrutan sel inflamasi dan akhirnya terjadi fibrosis. Kompleks imun mengaktifkan sel ginjal melalui *Toll-like receptors* (TLRs) untuk menghasilkan mediator inflamasi, sehingga terjadikerusakan mikrovaskuler ginjal dan trombosis, terutama pada pasien dengan antibodi anti-fosfolipid (Schwartz, 2007; Maroz dan Segal, 2013; Lech dan Anders, 2013).

Lupus nefritis adalah gambaran potensial serius dari LES. LES dapat mempengaruhi banyak organ mulai dari ginjal, kulit, selaput jantung, paru-paru, sistem saraf dan lainnya. Meskipun LES biasanya melalui siklus periode flare dan

remisi, pasien sering akhirnya mengalami kematian akibat penyakit ginjal stadium terminal atau kerusakan kardiovaskular. Insiden LES pada wanita adalah sembilan kali lebih tinggi dari pada laki-laki. Manifestasi ginjal mungkin temuan gejala pertama, sering ditemukan dalam satu tahun setelah diagnosis tetapi biasanya kadang-kadang dalam lima tahun pertama setelah diagnosis. LES ditandai oleh adanya berbagai autoantibodi yang dapat membentuk kompleks imun yang mengendap di ginjal, memberikan kontribusi besar terhadap patogenesis lupus nefritis. Terjadinya lupus nefritis diprakarsai oleh adanya peran kaskade komplemen, autoantibodi, intoleransi, dan cross-talk imunitas adaptif dengan sistem kekebalan tubuh bawaan, perekrutan sel inflamasi dan akhirnya terjadi fibrosis yang mendorong terjadinya kerusakan ginjal (Sterner dkk., 2014; Lech dan Anders, 2013). Kompleks imun mengaktifkan sel ginjal melalui *Toll-like receptors* (TLRs) untuk menghasilkan mediator inflamasi, sehingga terjadikerusakan mikrovaskuler ginjal dan trombosis, terutama pada pasien dengan antibodi anti-fosfolipid (Schwartz, 2007; Maroz dan Segal, 2013; Lech dan Anders, 2013).

Peningkatan ekspresi sitokin oleh deposit imun dan/atau autoantibodi dalam tahap inisiasi penyakit, akan menyebabkan ekspresi sitokin/kemokin inflamasi dan infiltrasi dan aktivasi leukosit. Leukosit yang teraktivasi akan menghasilkan sitokin, yang memperkuat respons inflamasi. Selanjutnya, produksi sitokin oleh beberapa pemicu terkait dengan progresifitas lupus nefritis. Dengan demikian, sitokin berperan penting dari fase inisiasi sampai progresifitas lupus nefritis (Gambar 2.5). Beberapa model hewan memberikan bukti terapi antisitokin

menekan progresifitas lupus nefritis. Namun, bukti yang cukup belum tersedia untuk memperjelas kemanjuran terapi antisitokin untuk lupus nefritis pada manusia (Iwata dkk., 2011).



2.5. Peran sitokin dalam pathogenesis lupus nefritis (Iwata dkk., 2011).

Sitokin berkontribusi pada patogenesis lupus nephritis dari fase inisiasi sampai tahap progresifitas penyakit. Deposit imun dan/atau autoantibodi menginduksi sekresi sitokin dalam sel residen ginjal, yang meningkatkan infiltrasi dan aktivasi leukosit pada tahap inisiasi penyakit. Leukosit aktif juga memproduksi sitokin, yang mengarah ke respon kekebalan lanjut dalam tahap penyakit amplifikasi / perkembangan.

Pengendapan kompleks imun memicu kaskade kejadian respons inflamasi disertai dengan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS), yang memainkan peran penting dalam cedera glomerulus akut dan kronis pada pasien lupus nefritis. Deteksi oksidasi lipid, kerusakan DNA oksidatif, dan oksidasi protein pada pasien lupus memberikan bukti yang kuat adanya keterlibatan ROS pada penyakit ini. Selain itu, beberapa mekanisme ROS meningkatkan kerusakan jaringan akut dan kronis pada lupus nefritis (Jiang dkk., 2014).

2.2. Terapi Lupus Nefritis

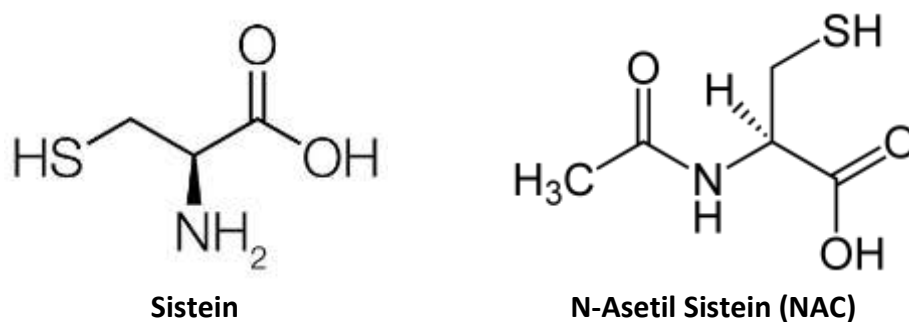
Prinsip dasar tujuan pengobatan lupus nefritis adalah menekan reaksi inflamasi lupus, memperbaiki fungsi ginjal atau setidaknya mempertahankan fungsi ginjal agar tidak menjadi penyakit ginjal stadium akhir dan menurunkan risiko penyakit ginjal kronis dan aterosklerosis dan konsekuensi metabolik. Pengobatan sebaiknya diberikan setelah didapatkan hasil pemeriksaan histopatologi dari ginjal. Pengobatan juga dapat mempermudah kontrol tekanan darah dan membantu menghindari komplikasi vaskular hipertensi. Selain itu, pengobatan sindrom nefrotik dapat mengurangi morbiditas terkait dengan overload cairan, hipoalbuminemia, dan risiko thrombosis (Ward, 2014). Medikamentosa berupa kortikosteroid dan agen immunosupresif. Dialisis dapat dilakukan untuk mengontrol gejala gagal ginjal. Transplantasi ginjal juga direkomendasikan (pasien dengan lupus yang aktif tidak boleh dilakukan transplantasi ginjal) (McPhee dan Papadakis, 2011).

Perjalanan penyakit nefritis lupus bervariasi antar pasien LES, bahkan pada mereka yang memiliki tipe histologis yang sama. Agen immunosupresif dapat menginduksi remisi pada sebagian besar pasien dengan nefritis lupus proliferasif, tetapi sebagian proporsi dari mereka- berkisar antara 27-66% pada berbagai studi- akan mengalami flare. Flare merupakan masalah karena bahaya kerusakan kumulatif yang dapat menurunkan fungsi ginjal dan juga toksisitas akibat immunosupresi tambahan. Terapi rumatan dengan azathioprine, mycophenolate mofetil atau pulse siklofosfamid biasanya direkomendasikan. Flare renal dapat dikategorikan sebagai nefritik atau nefrotik dan bisa ringan atau berat. Mayoritas

pasien yang mengalami flare dapat pulih fungsi ginjalnya, bila didiagnosis dan diobati segera (McPhee dan Papadakis, 2011).

3. N-Asetil Sistein

N-Asetil Sistein bekerja sebagai *direct antioxidant* karena mempunyai gugus thiol (SH) bebas yang dapat berinteraksi langsung dengan elektron dari ROS. Interaksi N-Asetil Sistein dengan ROS menyebabkan pembentukan radikal N-Asetil Sistein *thiol* dan N-Asetil Sistein disulfid sebagai produk akhir utama. Selain itu N-Asetil Sistein juga berperan sebagai antioksidan tidak langsung di mana N-Asetil Sistein akan dimetabolisme sebagai sistein yang merupakan prekursor *glutathione* intrasel sehingga akan meningkatkan aktifitas enzim *glutathione S-transferase* mensuplai *glutathione* untuk *glutathione peroksidase* (Marcelo dkk, 2010).



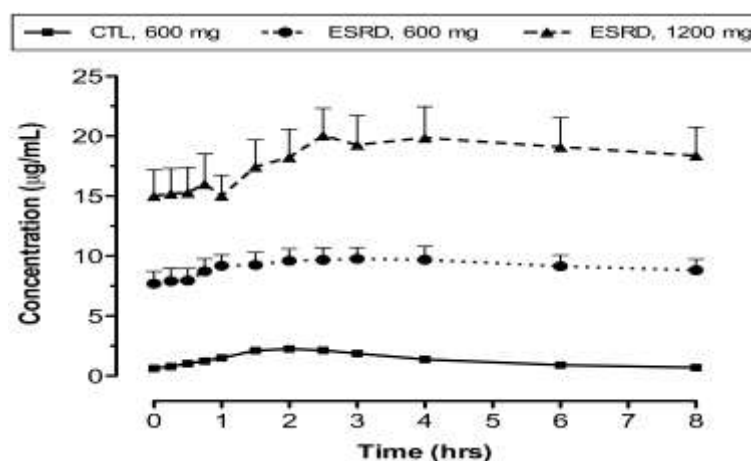
Gambar 2.6. Struktur molekul N-Asetil Sistein (Heloisa dkk., 2005)

Antioksidan melindungi DNA didalam gen dari serangan radikal bebas. Pertahanan antioksidan yang kuat dapat menghentikan radikal bebas sebelum mereka dapat menyerang DNA (Hayakawa dkk, 2003).

Farmakodinamik N-Asetil Sistein:

1. N-Asetil Sistein sebagai *pre-cursor* Glutation (GSH) atau *indirect antioxidant*, *direct antioxidant* menetralsir oxidant (ROS dan RNS) menghilangkan keadaan stress-oksidatif dan memperbaiki disfungsi sel (Oikawa, 2005).
- 2 N-Asetil Sistein mengontrol pelepasan mediator pro-inflamasi sistemik seperti kemokin, sitokin agar bekerja tidak berlebihan sehingga menyebabkan inflamasi kronik (Borras dkk., 2004).
3. N-Asetil Sistein bekerja sebagai *immune-booster*(meningkatkan sistem imunitas) dengan meningkatkan aktivitas sel imunitas (T-limfosit, makrofag, neutrofil) untuk memfagositosis dan melisis bakteri atau benda asing sehingga memperbaiki daya tahan terhadap infeksi, meningkatkan kemampuan antioksidan, mengembalikan keseimbangan redox (*reduced and oxidized*) glutathione selular. Mengembalikan keseimbangan redox ini sangat penting dalam mengatur respon terhadap inflamasi (Hansen dkk, 2004).
4. N-Asetil Sistein mencegah kerusakan membran sel dan lipid peroxidasi sehingga tidak terjadi dampak berlebihan dari leukotrein seperti vasokonstriksi dan bronkokonstriksi. Sebagai hasil akhir kerja N-Asetil Sistein sebagai *immune booster* dapat mengurangi frekuensi dan keparahan infeksi (Voghel dkk., 2008).
5. N-Asetil Sistein memperbaiki struktur, bentuk dan fungsi sel darah merah sebagai pembawa oksigen sehingga memperbaiki keadaan hipoksemia (Voghel dkk., 2008).

6. N-Asetil Sistein bekerja sebagai *true-mucolytic pada* bronkhitis dan penyakit paru sudah banyak digunakan (Cuzzocrea dkk, 2001).



Gambar 2.7. Farmakodinamik N-Asetil Sistein (Nolin dkk, 2010)

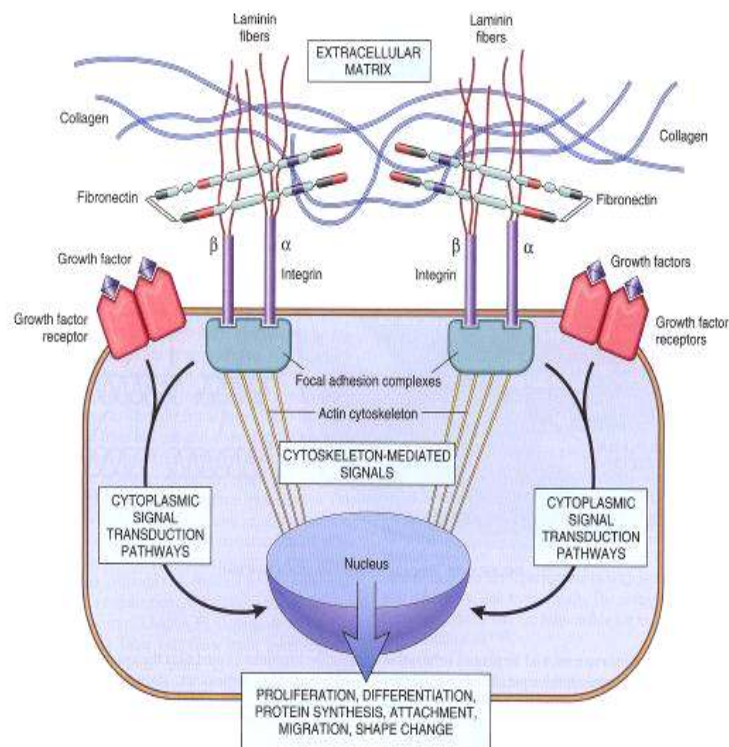
Setelah pemberian N-Asetil Sistein perinjeksi, N-Asetil Sistein akan diserap plasma dan konsentrasi plasma puncak 0.35-4 mg/ L dicapai dalam 1-2 jam sedangkan distribusi volume mengikat protein plasma berkisar 0.33-0.47 L/ kg. N-Asetil Sistein akan mencapai waktu paruh 4 jam setelah injeksi intravena. Klirens ginjal 0.190-0.211 L/ h/ kg dan sekitar 70% dari pembersihan tubuh total nonrenal (Nolin dkk, 2010).

4. Peran interstisial fibrosis pada nefritis lupus

Fibrosis ginjal ditandai dengan akumulasi fibroblas dan protein matriks yang berlebihan bersama dengan hilangnya fungsi nefron merupakan ciri patologis utama penyakit ginjal progresif. Banyak penelitian menunjukkan bahwa fibrosis ginjal progresif dimediasi oleh beberapa mediator termasuk faktor

pertumbuhan, sitokin, toksin metabolisme, dan molekul stres melalui beberapa mekanisme dan jalur. Di antara mereka, TGF- β 1 telah diakui sebagai mediator kunci dalam patogenesis fibrosis ginjal (Lan, 2011).

Pada lupus nefritis, TGF- β merupakan molekul vital yang berkontribusi untuk terjadinya glomerulosklerosis. Dalam penyakit tersebut, dicirikan oleh akumulasi ECM yang berlebihan, secara bermakna terjadi peningkatan ekspresi TGF- β dan reseptor TGF- β pada glomerulus dan tubulointerstitiil. Kadar TGF- β dalam urin meningkat pada pasien dengan penyakit ginjal, seiring dengan meningkatnya derajat proteinuria, fibrosis interstitiil dan matriks mesangial. TGF- β menginduksi penebalan membran basal melalui stimulasi sel ginjal untuk menghasilkan lebih banyak ECM. Induksi perubahan patofisiologi sel ginjal, seperti hipertrofi, apoptosis dan kelainan Podosit, menyebabkan berkurangnya filtrasi glomerulus dan hilangnya kapiler glomerulus dan interstitial, fibrosis tubulointerstitial dan atrofi tubular, sehingga terjadi disfungsi ginjal permanen (Loeffler dan Wolf, 2013).

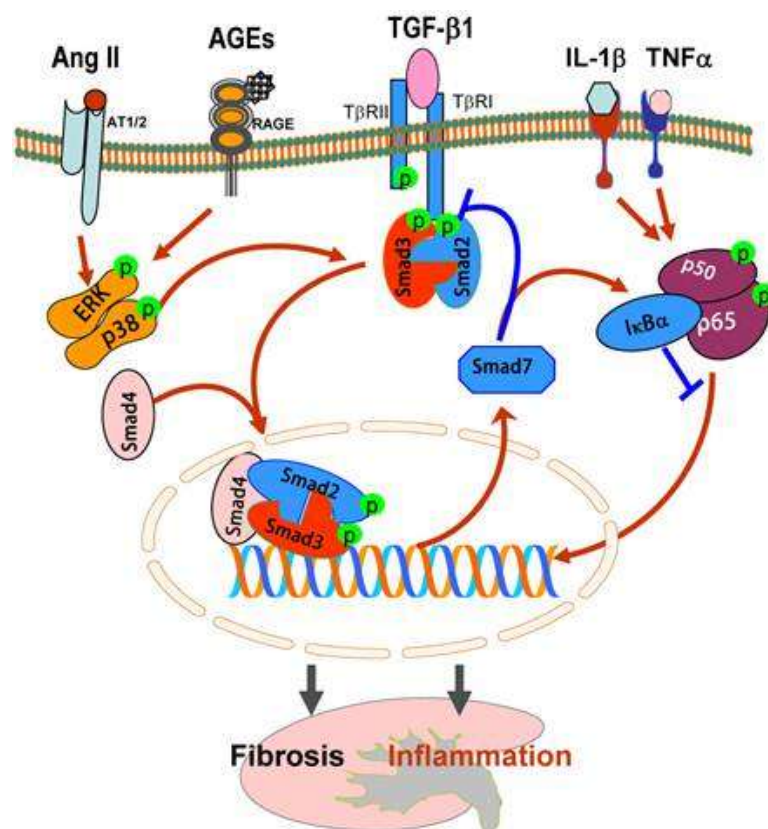


Gambar 2.8. Mekanisme Fibrosis(Robbins dan Cotran, 2005)

Angiotensin II juga merangsang penyerapan protein yang di ultrafilter ke dalam sel tubular dan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi dalam sel. Terjadi migrasi makrofag dan sel inflamasi lainnya ke tubulo-interstitium. Peningkatan sintesis dan penurunan protein matriks ekstraselular dalam sel-sel tubular dan fibroblas interstisial berkontribusi pada fibrosis interstisial. Selain itu, konsentrasi angiotensin II dan TGF- β 1 yang tinggi menyebabkan sel-sel tubular dapat mengubah fenotipnya dan menjadi fibroblas melalui suatu proses yang disebut EMT yang berkontribusi pada fibrosis interstitial dan atrofi tubular karena sel-sel epitel menghilang (Ziyadeh dan Wolf, 2008).

Perkembangan penelitian terbaru, didapatkan bahwa *bone morphogenic protein-7* (BMP-7) yang diekspresikan pada sel-sel tubulus distal ginjal. BMP-7

merupakan superfamili dari TGF- β , yang memiliki efek berlawanan (antagonis). Dari hasil berbagai penelitian pemberian BMP-7 akan mengurangi aktivitas TGF- β 1 sehingga mencegah terjadinya glomerulosklerosis dan interstitial fibrosis (Motazed dkk., 2008; Zeisberg dan Kalluri, 2008).



Gambar 2.9. Jalur crosstalk TGF- β /Smads pada fibrosis dan inflamasi ginjal.

Setelah mengikat T β RII, TGF- β 1 mengaktifkan T β RI-kinase yang memfosforilasi Smad2 dan Smad3. Smad2 dan Smad3 yang terfosforilasi kemudian mengikat Smad4 dan membentuk kompleks Smad, yang translokasi ke dalam inti dan mengatur transkripsi gen sasaran, termasuk Smad7. Smad7 adalah penghambat Smad yang berfungsi untuk memblokir aktivasi Smad 2/3 dengan mendegradasi T β RI dan Smads dan menghambat respons inflamasi yang digerakkan NF- κ B dengan menginduksi I κ B α (penghambat NF- κ B). Perhatikan bahwa Ang II dan AGEs dapat mengaktifkan Smads yang tidak tergantung TGF- β 1 melalui jalur *crosstalk* ERK/p38/MAPK. Garis biru (simbol) menunjukkan jalur regulasi negatif atau pelindung, sedangkan panah merah (simbol) merupakan jalur regulasi positif atau patogenik (Lan, 2011).

Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa TGF- β 1 merupakan mediator kunci dalam patogenesis fibrosis ginjal karena TGF- β 1 sangat ditingkatkan pada penyakit ginjal dengan fibrosis ginjal berat. TGF- β 1 menjadi perantara fibrosis ginjal progresif dengan merangsang produksi sekaligus menghambat degradasi ECM. Selain itu, TGF- β 1 juga menjadi perantara fibrosis ginjal dengan menginduksi transformasi sel epitel tubular menjadi miofibroblas melalui EMT (Huang dkk., 2008; Lan, 2011).

5. Peran IL-17 pada lupus nefritis

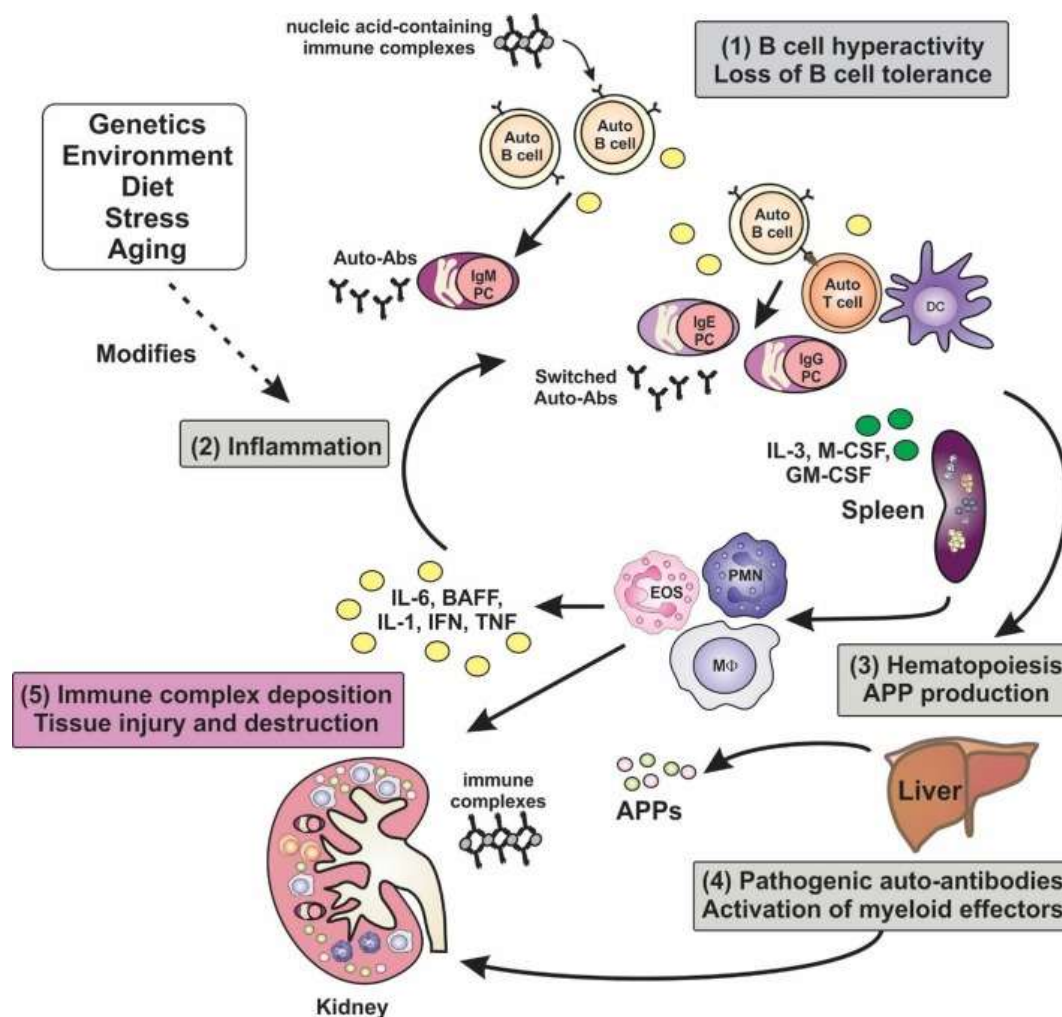
Lupus nephritis adalah manifestasi klinis utama dari LES. Sitokin berlebih memainkan peran penting dalam patogenesis lupus nefritis. Pada tahap awal penyakit ini, endapan kompleks imun-autoantibodi menginduksi produksi sitokin dalam sel peyangga ginjal, menyebabkan ekspresi sitokin/kemokin inflamasi berlanjut dan terjadi infiltrasi dan aktivasi leukosit. Infiltrasi leukosit, seperti makrofag dan sel dendrit, mensekresikan berbagai sitokin dan mengaktifkan sel-sel T naif, menyebabkan profil sitokin ke arah T helper (Th) 1, Th2, dan/atau Th17 (Iwata dkk., 2011).

Endapan kompleks imun glomerulus sebagian besar ditemukan di mesangium, subendotel, dan lesi subepitel. Terutama, endapan mesangial dan subendotel menyebabkan pola proliferasi dari lupus nefritis. Endapan kompleks imun mengaktifkan kaskade komplemen, menyebabkan aktivasi dan proliferasi sel mesangial. Setelah diaktifkan, sel mesangial memproduksi berbagai jenis sitokin dan kemokin, yang menyebabkan progresifitas penyakit glomerulus. Selain cedera

glomerulus yang diperantarai kompleks imun, auto-antibodi juga dapat meningkatkan proliferasi dan aktivasi sel penyangga ginjal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi anti-DNA akan menginduksi sekresi IL-1 β , IL-6, dan TNF- α pada kultur sel mesangial dan sel epitel tubular manusia. Pengamatan ini menunjukkan bahwa sel-sel penyangga ginjal diaktifkan oleh kompleks imun dan/atau auto-antibodi untuk mensekresikan sitokin, yang selanjutnya dapat memperkuat proses inflamasi. Selain itu juga menunjukkan bahwa antibodi anti-DNA akan menginduksi aktivasi protein kinase C, yang merupakan jalur sinyal yang menyebabkan sintesis sitokin dalam sel mesangial manusia (Iwata dkk., 2011).

Interleukin 17 merupakan sitokin yang sangat berperan pada reaksi tipe-lambat, dipicu oleh peningkatan produksi khemokin dalam sejumlah jaringan untuk merekrut monosit dan netrofil ke sisi inflamasi. IL-17 diproduksi sel Th17 dan diinduksi oleh IL-23 yang akan merusak jaringan pada reaksi tipe lambat (Kuby dkk.,2007). IL-17 sebagai sitokin pro-inflamasi yang merespons terhadap invasi patogen ekstraseluler dan menginduksi kerusakan matriks seluler patogen. IL-17 bertindak sinergik dengan TNF dan IL-1 (Miossec dkk.,2009). Untuk dapat melakukan fungsinya, IL-17 akan berikatan dengan reseptor permukaan sel yang dikenal dengan IL-17R yang terdiri dari IL17RA, IL17RB, dan IL17RC (Starnes dkk.,2002). Selain IL-17A, anggota IL-17 termasuk IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (juga disebut IL-25), dan IL-17F. Semua anggota IL-17 memiliki struktur protein yang sama, dengan empat residu sistein, namun urutan asam aminonya tidak memiliki kesamaan (Kolls dan Lindén, 2004). Interleukin-17

terdeteksi pada sel T yang menginfiltrasi ke glomerulus dan interstisial. Tingkat ekspresi IL-17 berkorelasi dengan skor SLEDAI (Wang dkk., 2010;Gottschalk dkk., 2015).



Gambar 2.10. Inflamasi merupakan faktor kunci dalam patogenesis lupus (Gottschalk dkk., 2015).

Tanda khas dari lupus adalah adanya sel B hiperaktif dan hilangnya toleransi sel-B. Kompleks imun yang mengandung autoantigen asam nukleat dapat terlibat dan mengaktifkan TLR endosomal dan meningkatkan peradangan pada LES. Selain itu ekspansi sel plasma dan produksi autoantibodi juga berperan, meskipun autoantibodi jinak apabila dihasilkan dalam lingkungan inflamasi, akan terjadi kelas-switching menjadi isotipe patogen. Sitokin proinflamasi tidak hanya mendorong aktivasi sel T dan pematangan sel dendrit, tetapi mereka dapat merangsang hematopoiesis ekstrasmedular menyebabkan ekspansi sel imunitas bawaan, dan mereka dapat menginduksi produksi protein fase akut. Autoantibodi diendapkan dalam jaringan seperti glomeruli ginjal, menyebabkan aktivasi sel efektor myeloid melalui reseptor Fcγ dan komplemen, yang menyebabkan kerusakan jaringan. Banyak faktor, termasuk genetik, lingkungan, pola makan, dan stres, dapat memodifikasi perjalanan dan tingkat keparahan penyakit.

B. Penelitian Relevan

Sejumlah hasil penelitian yang relevan antara lain:

- a) Kadar IL-17 serum meningkat pada LES yang terjadi pada masa kanak-kanak dan memainkan peran dalam patogenesis manifestasi neuropsikiatri dan ginjal (Peliçari dkk., 2015).
- b) Jumlah sel Th17 berkorelasi dengan skor aktivitas penyakit (SLEDAI) dan perubahan histopatologi di ginjal pada lupus nefritis (Chen dkk., 2012).
- c) Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian dari pasien lupus nefritis memperlihatkan fenotipe Th17 yang dapat mempengaruhi respons terhadap pengobatan dan dapat dievaluasi sebagai biomarker untuk respons terapi yang buruk (Schmidt dkk., 2015).
- d) Hasil laporan kasus dan telaah pustaka dari Tewthanom dkk (2010), memperlihatkan pemberian N-acetylcysteine (NAC) yang memiliki aktivitas antioksidan kuat dapat memberikan hasil yang memuaskan ketika ditambahkan pada terapi standar. Dilaporkan kasus seorang pasien lupus nefritis 46 tahun yang diberikan 1.800 mg NAC secara oral, menunjukkan kadar glutathione yang lebih tinggi, dan kadar malondialdehid yang normal. Selain itu, kadar protein urin, jumlah sel darah lengkap dan pemeriksaan fisik dari organ yang terkena menunjukkan perbaikan. Namun, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengkonfirmasi nilai manfaat NAC dosis tinggi pada pasien lupus nefritis (Tewthanom dkk., 2010).

Penjelasan (Narasi) Kerangka Teori:

Pristan (*2,6,10,14-Tetramethylpentadecane*) adalah alkana isoprenoid yang awalnya diisolasi dari minyak hati ikan hiu, kini sintesis pristane diproduksi untuk menggantikannya dalam penelitian. Pristane digunakan untuk menginduksi plasmasitoma pada mencit model multiple myeloma, nefritis lupus, ataupun penyakit-penyakit autoimunan rheumatoid arthritis (Reeves dkk.,2009). Untuk membuat mencit model lupus, bisa digunakan dengan *single* injeksi 0,5 ml pristan intraperitoneal (Chowdhary dkk.,2007). Injeksi pristan akan menginduksi terjadinya aktivasi NF κ B yang berada pada makrofag intraperitoneal untuk memproduksi sitokin proinflamasi. Sitokin IL-6 akan menginduksi endotelin, endotelin akan mengaktifkan NADPH dan terbentuklah ROS. Selain itu, TNF- α juga akan mengaktifkan NADPH untuk membentuk ROS.

Aktivasi NF κ B juga akan meningkatkan produksi faktor pertumbuhan termasuk TGF- β 1. TGF- β 1 akan merangsang sel target, yaitu sel fibroblas, sel mesangial, podosit, sel tubulus dan sel endotel. Aktivasi sel-sel target ini akan memicu terbentuknya ECM. Sel fibroblas akan mengekspresikan kolagen tipe-I dan akhirnya menyebabkan terjadinya fibrosis interstisial pada ginjal. Sedangkan sel mesangial yang terletak pada glomerulus akan mengekspresikan kolagen tipe-IV, selanjutnya akan menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis (Bambang, 2010; Loeffler dan Wolf, 2013). Aktivasi TGF- β 1 pada sel podosit, menyebabkan produksi ECM, abnormalitas proses podosit, apoptosis sel, dan transisi sel epitel menjadi mesangial, selanjutnya menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis. TGF- β 1 juga akan mengaktifkan sel endotel untuk memproduksi ECM, proliferasi

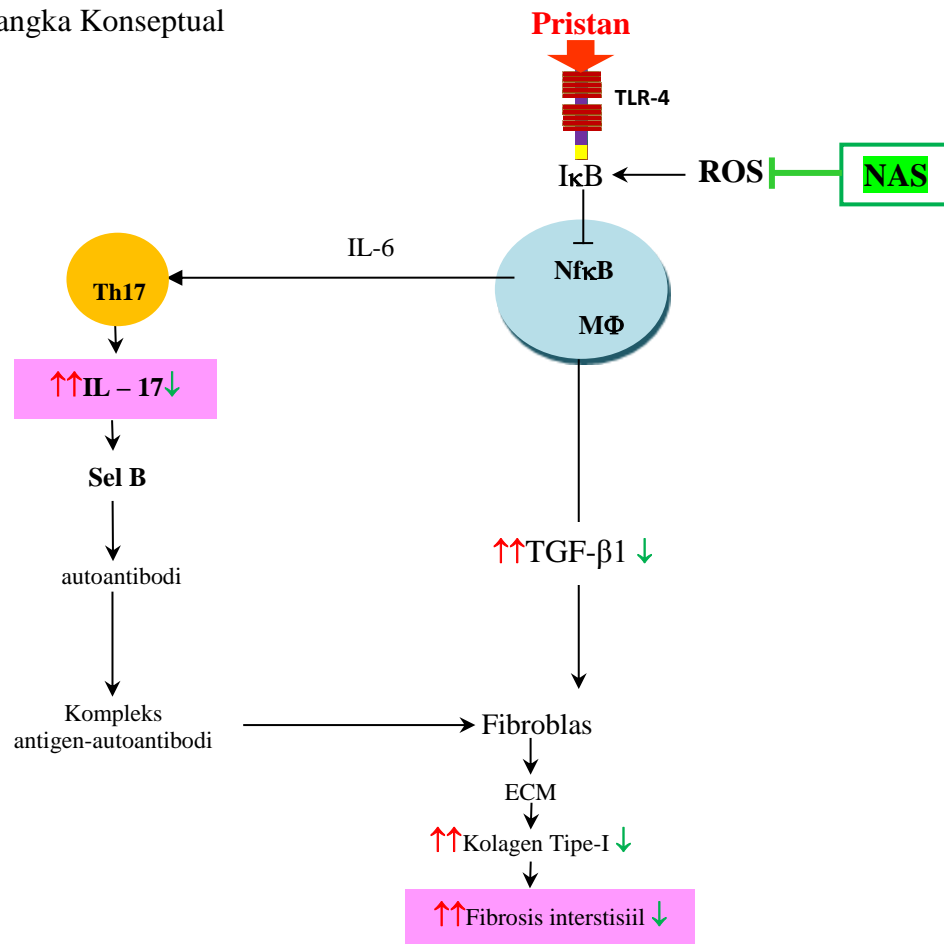
sel, apoptosis sel dan transisi sel endotel menjadi mesensimal, selanjutnya menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis dan fibrosis interstisial pada ginjal. Aktivasi TGF- β 1 pada sel tubulus ginjal, menyebabkan produksi ECM, proliferasi sel, apoptosis sel dan transisi sel epitel menjadi mesensimal, selanjutnya menyebabkan terjadinya fibrosis interstisial pada ginjal. Produksi TNF- α , juga akan menyebabkan terjadinya apoptosis yang berlebihan dari sel mesangial, podosit, sel tubulus dan sel endotel (Loeffler dan Wolf, 2013).

Injeksi pristan i.p. juga akan menyebabkan aktivasi IL-23 selanjutnya memicu sel Th17 untuk mensekresikan IL-17. IL-17 akan merangsang sel B untuk memproduksi dan mensekresikan autoantibodi, selanjutnya akan terbentuk kompleks atigen-autoantibodi. Kompleks atigen-autoantibodi yang berada di sirkulasi akhirnya akan terdisposisi pada sel target, termasuk sel fibroblas, sel mesangial, podosit, sel tubulus dan sel endotel di glomerulus. Kompleks ini akan menyebabkan terjadinya glomerulosklerosis dan fibrosis interstisial pada ginjal, selanjutnya menyebabkan kerusakan pada ginjal dan terjadilah mikroalbuminuria. Disamping itu, terjadinya disfungsi endotel pada pembuluh darah, juga akan terjadi disfungsi endotel kapiler glomerulus yang akan mengurangi negatifitas sehingga terjadi albuminuria.

Reaksi inflamasi akibat bahan-bahan kimiawi (pristan) dan fragmentasi sel ataupun molekul *damage-associated molecular pattern* (DAMP) akibat proses apoptosis dapat menimbulkan aktivasi makrofag, selanjutnya Nf κ B menjadi lebih aktif sehingga akan mengekspresikan sitokin-sitokin pro-inflamasi antara lain TNF- α , IL-1 maupun IL-6. Selain itu juga akan mengekspresikan TGF β 1. TNF-

α bersifat proteolitik, akan merusak glikoprotein sehingga muatan negatif permukaan podosit menjadi berkurang. Keadaan ini akan menyebabkan daya tolak-menolak antara podosit dan albumin berkurang, akhirnya albumin mudah menembus membran filtrasi dan akan terjadi mikroalbuminuria. $\text{TNF-}\alpha$ akan merangsang endotel sehingga endotel akan mengekspresikan E-selektin, dimana E-selektin akan mengikat PMN dan PMN tersebut akan mengekspresikan MMP-9. MMP-9 akan mendegradasi kolagen yang diekspresikan oleh fibroblast maupun sel mesangial. Dalam keadaan normal sesuai dengan hukum Homeostasis, terjadi keseimbangan pengaruh $\text{TGF-}\beta 1$ dan MMP-9. $\text{TGF-}\beta 1$ juga menghambat ekspresi MMP-9 yang diekspresikan oleh PMN. Hipotesis penelitian kami pemberian pristan akan menyebabkan ekspresi $\text{TGF-}\beta 1$ lebih dominan dari pada MMP-9, akibatnya terjadi interstitial fibrosis (Bambang, 2010).

2. Kerangka Konseptual



Gambar 2.12. kerangka konseptual

Keterangan:

→	: mengaktivasi	↑	: meningkatkan (Efek Pristan)
—	: menghambat	↓	: menurunkan (Efek NAS)
MΦ	: Makrofag	■	: variabel yang diteliti
TLR-4	: Toll like receptor – 4	NfκB	: Nuklear factor kappa beta
ECM	: Extracellular matrix	IκB	: Inhibitor of kappa beta
ROS	: Reactive Oxygen Species		

D. Hipotesis Penelitian

1. Ada pengaruh pemberian N-asetil sistein terhadap penurunan ekspresi IL-17 glomerulus pada mencit nefritis lupus.
2. Ada pengaruh pemberian N-asetil sistein terhadap penurunan fibrosis interstisial pada mencit nefritis lupus.

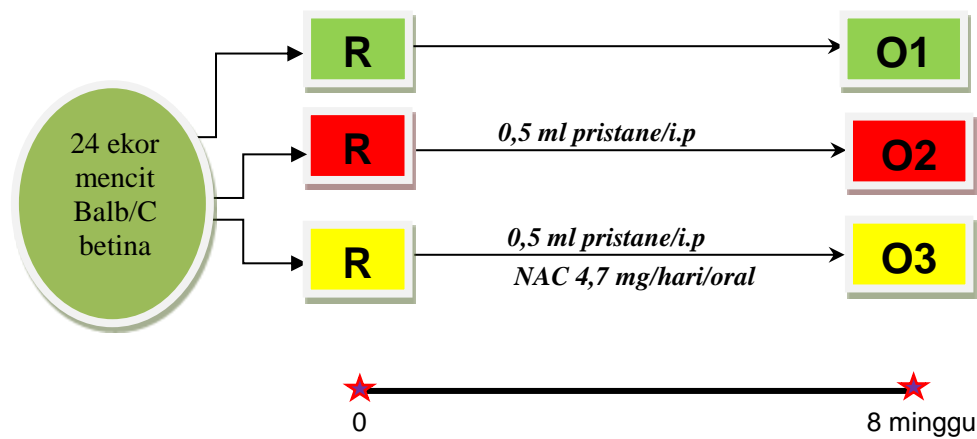
BAB 3

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental, terhadap mencit sebagai hewan coba. Dipilihnya jenis penelitian ini karena dapat menghasilkan data dengan validitas yang tinggi dan perlakuan dapat diatur oleh peneliti. Pengukuran awal tidak dilakukan karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi, sehingga dapat dikembangkan rancangan eksperimental tanpa adanya pengukuran awal (*pretest*) tetapi hanya pengukuran akhir (*post test*) / *post-test only control group design* (Sastroasmoro dan Ismael, 2011), dengan rancangan penelitian sebagai berikut:

Bagan Rancangan Penelitian



Gambar 3.1. Bagan Rancangan Penelitian

Keterangan:

- O₁ : Observasi kelompok kontrol setelah 8 minggu
- O₂ : Observasi kelompok perlakuan(nefritis lupus) setelah 8 minggu
- O₃ : Observasi kelompok terapi(nefritis lupus+NAC) setelah 8 minggu

B. Tempat dan waktu penelitian

Tempat penelitian:

- a. Tempat pemeliharaan dan induksi hewan dilakukan di kandang hewan percobaan Laboratorium Histologis Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.
- b. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret untuk pemeriksaan dan pembuatan preparat imunohistokimia.

Waktu yang diperlukan dalam penelitian ini selama 5 bulan (Januari s/d Mei 2016).

C. Subjek Penelitian dan Besar Sampel

Subjek penelitian adalah mencit, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gajah Mada. Bahan makanan mencit digunakan pakan mencit standar BR I.

Kriteria inklusi :

- 1) Mencit betina sehat. Mencit sehat adalah mencit dengan kondisi mata bersinar, bulu tidak kusam, aktif dan nafsu makan baik (Kusumawati, 2004).
- 2) sub spesies *Mus musculus* galur Balb/C.
- 3) umur 6–8 minggu.
- 4) berat badan 20–30 gram.

Kriteria eksklusi :

- 1) Mencit mati saat penelitian.

Penelitian eksperimental ini dilakukan pada populasi (N) tidak diketahui.

Rumus yang dipakai untuk menentukan besar sampel (n) adalah:

$$n = \left[\frac{(Z^{1/2}\alpha + Z\beta) \sigma}{\delta} \right]^2 \quad (\text{Steel dan Torrie, 1980})$$

Karena σ^2 sulit ditaksir dari literatur, studi yang sama sebelumnya atau studi pendahuluan oleh peneliti, maka diasumsikan $\sigma^2 \approx \delta^2$, sehingga hasilnya

$$n = (Z^{1/2}\alpha + Z\beta)^2$$

$$n = (1,645 + 0,842)^2 = 6,185 \text{ dibulatkan menjadi } 7$$

Keterangan:

n = besar sampel masing-masing kelompok

$Z^{1/2}\alpha$ = nilai standar normal, yang besarnya tergantung α

$$\text{Bila } \alpha = 0,05 \rightarrow Z^{1/2}\alpha = 1,645$$

$Z\beta$ = nilainya tergantung β yang ditentukan (berdasarkan tabel)

β = *error* untuk menerima H_0 , bila H_0 salah

$$\text{Bila } \beta = 0,08 \rightarrow Z\beta = 0,842$$

δ = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan oleh peneliti

σ = standar deviasi

Berdasar rumus didapatkan jumlah sampel minimal adalah tujuh ekor. Dalam penelitian ini digunakan delapan ekor mencit untuk setiap kelompok observasinya, sehingga telah memenuhi batas minimal sampel.

D. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Klasifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel bebas : N-asetil sistein

b. Variabel tergantung :

Variabel tergantung adalah variabel yang akan diteliti yaitu meliputi:

- 1) Ekspresi IL-17 di glomerulus ginjal
- 2) Derajat fibrosis interstisial.

c. Variabel kendali:

- 1) Hewan coba: jenis mencit, umur dan jenis kelamin, homogen.
- 2) Pemeliharaan dan bahan makanan, minuman, sanitasi kandang, kelembaban dikondisikan sama.
- 3) Injeksi: teknik injeksi intraperitoneal dan sonde pada mencit.
- 4) Pengambilan ginjal: teknik pengambilan ginjal dan jenis alat yang digunakan untuk pemeriksaan IHC dan Histopatologis.

2. Definisi Operasional

a. Hewan percobaan adalah mencit Galur Balb/Cbetina (*Mus musculus*) umur 3-4 bulan, berat badan 20-30 gram.

b. Mencit sehat adalah mencit dengan kondisi mata bersinar, bulu tidak kusam, aktif, nafsu makan baik.

c. Hewan coba model lupus nefritis induksi pristan.

Pristan adalah zat kimiawi (2,6,10,14-Tetramethylpentadecane/ TMPD) suatu alkana isoprenoid yang biasa digunakan untuk induksi hewan coba model

nefritis lupus. Diberikan secara intraperitoneal dengan dosis *single* injeksi 0,5 ml pristana intraperitoneal (Chowdhary dkk.,2007).

Berbeda dengan model tikus lupus nefritis lainnya, di mana faktor genetik memainkan peran utama, model tikus induksi pristana mengembangkan lupus setelah terpapar pemicu lingkungan tertentu. Suntikan intraperitoneal pristana adalah metode standar untuk mendapatkan cairan asites yang diperkaya dengan antibodi monoklonal. Pemberian pristana pada mencit Balb/c menginduksi autoantibodi karakteristik lupus, selain juga memiliki deposisi kompleks imun di dalam ginjal menyebabkan proteinuria berat dan nefritis. Seperti pasien SLE manusia, lupus induksi pristana lebih parah pada mencit betina dibandingkan mencit jantan (Perry dkk., 2011).

d. N-Asetil Sistein

Adalah obat yang bersifat nefroprotektif (antioksidatif dan antiinflamasi). Diberikan secara peroral (sonde) dengan dosis 4,7mg/hari (setara dengan dosis manusia 1.800 mg) dalam waktu delapan minggu.

e. Ekspresi IL-17 glomerulus dan tubulointerstitiil

Interleukin 17 merupakan protein (sitokin) yang bertindak sebagai mediator dalam reaksi tipe lambat dengan meningkatkan produksi kemokin di berbagai jaringan untuk merekrut monosit dan neutrofil ke tempat peradangan. IL-17 diproduksi oleh sel T-helper dan diinduksi oleh IL-23 yang menghasilkan kerusakan jaringan destruktif pada reaksi tipe lambat. Interleukin 17 sebagai sitokin proinflamasi yang merespon invasi sistem imunitas dengan patogen ekstraseluler dan menginduksi kerusakan matriks selular patogen. Interleukin

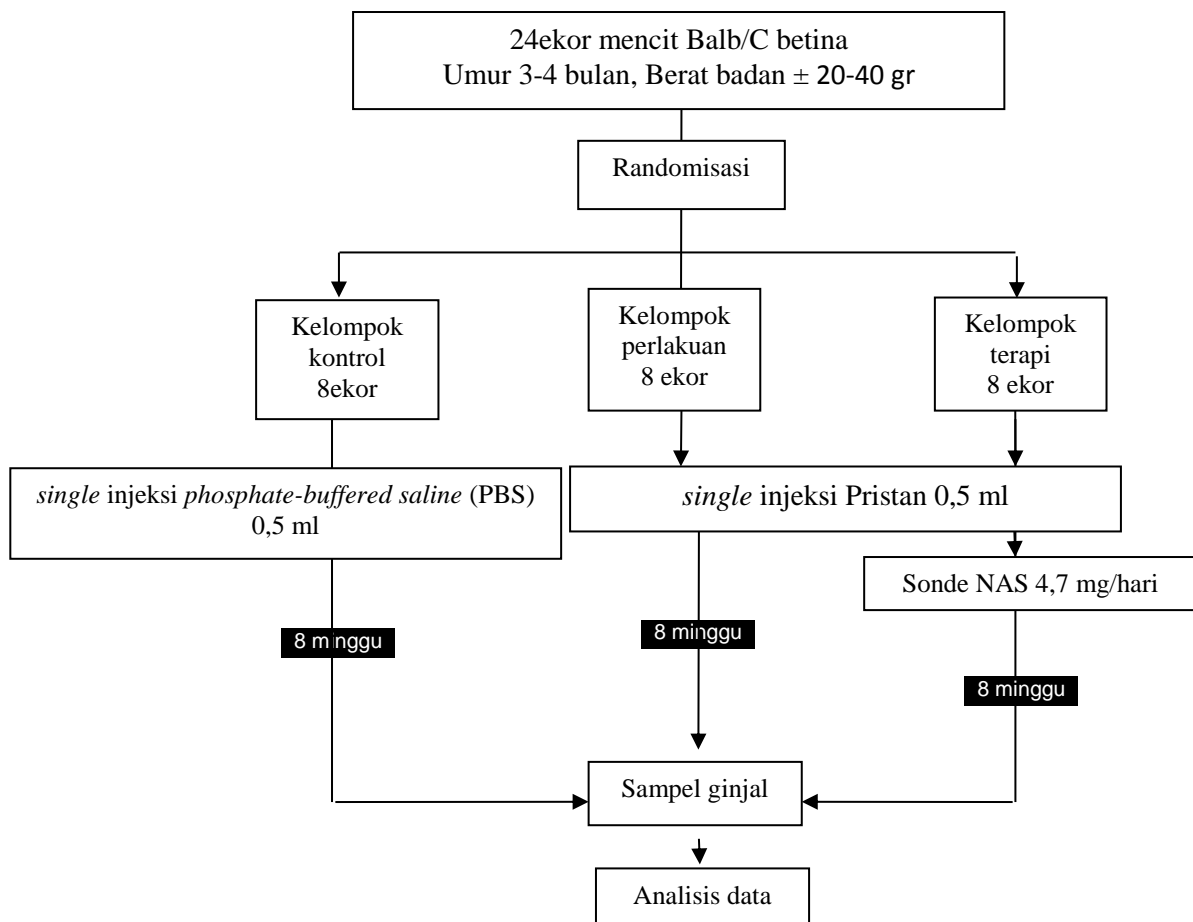
IL-17 memiliki aktivitas sinergis dengan TNF dan IL-1. Penilaian positifitas ekspresi IL-17 menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap IL-17. Cara ukur dinilai secara kuantitatif, visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap 100 sel, yang terlihat dinetrofil sebagai yang mengekspresikan IL-17. Kemudian dihitung jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif tercat coklat perak, pada membran sel. Jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dijumlahkan dan dimasukkan sebagai data. Skala data adalah rasio.

f. Derajat fibrosis interstisial ginjal

Suatu keadaan terjadinya penumpukan kolagen tipe-I yang berlebihan pada interstitial ginjal terutama disekitar fibroblas dan tubulus proksimal. Dimana dengan pengecatan Hematoksin eozin akan terlihat kemerahan. Penilaian interstitial fibrosis ditentukan secara kuantitatif dengan cara mengukur tebal jaringan interstitial dengan menggunakan mikrometer yang telah dikalibrasi pada pembesaran 400 x. Data untuk ketebalan interstitial fibrosis ditentukan dengan cara mengukur tebal interstitial fibrosis dengan mikrometer yang telah dikalibrasi, dimana satu skala mikrometer pada lensa okuler berarti 30 mikrometer (1 skala okuler = 30 mikron). Penentuan daerah yang diukur ditentukan secara subyektif pada area yang dianggap paling tebal. Pada setiap slide pengukuran dilakukan pada tiga lapangan pandang yang berbeda pada pemebesaran 400x. Selanjutnya hasil pengukuran pada setiap lapangan pandang dijumlahkan kemudian dibagi tiga (Tamaki *et. al*, 1994; Purwanto, 2010). Skala data adalah rasio.

E. Teknik Pengumpulan Data

Hari ke-56 penelitian, semua mencit dikorbankan dengan dislokasi servikal. Setelah mencit dikorbankan ginjal dikoleksi, untuk pembuatan preparat histologis ginjal. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dan histopatologis. Kerangka operasional penelitian ini disajikan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Kerangka operasional kajian Pristan dan N-asetil sistein terhadap ekspresi IL-17 glomerulus dan tubulus interstisial dan fibrosis interstisial ginjal mencit Balb/C model nefritis lupus

F. Teknik Pembuatan preparat dan Pengukuran Data

1. Teknik pembuatan preparat histologis ginjal

- a) Proses fiksasi. Jaringan yang diambil dari mencit yang telah dikorbankan dengan teknik dislokasi servikal, difiksasi dengan formalin buffer 10% selama 15-24 jam.
- b) Jaringan dicuci dengan air mengalir.
- c) Dilakukan proses dehidrasi untuk menarik air dari jaringan dengan memasukkan jaringan kedalam etanol secara bertahap agar tidak terjadi perubahan morfologi jaringan.

Alkohol dapat dipergunakan sebagai media antara dari fase air ke fase minyak. Tahap dehidrasi mulai dari konsentrasi 80% selama 2 jam, etanol 90% selama 2 jam, etanol 95% selama 1 jam dan etanol absolut tiga kali masing-masing selama 1 jam.

- d) Proses penjernihan (*clearing*) untuk mengganti dari fase air ke fase minyak. Bahan untuk penjernihan adalah *xylol*. Jaringan dimasukkan kedalam *xylol* dua kali selama masing-masing 1jam, diikuti dengan yang ketiga selama 2 jam.
- e) Proses penanaman (*impregnation*) adalah dengan memasukkan jaringan kedalam *histosec* cair sebanyak tiga kali masing-masing selama 2 jam.
- f) Proses pengeblokan (*embedding*) yaitu pembuatan balok parafin.
- g) Balok parafin disayat setebal 5-7 μm dengan mikrotom. Sayatan jaringan ditempelkan pada gelas objek yang telah dilapisi *poly-L-lysine*.

- h) Proses pengecatan dengan Verhoeff-Van Gieson.(Tomino, 2000; Purwanto, 2010).

2. Teknik pewarnaan imunohistokimia IL-17

Teknik pewarnaan imunohistokimia adalah pewarnaan imuno-peroksidase indirek dengan metode *avidin biotin complex* (ABC) tiga fase dengan tahapan sebagai berikut:

- a) Dilakukan deparafinisasi sayatan jaringan untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Deparafinisasi dilakukan dengan cara standar baku laboratorium, yaitu secara bertahap dengan waktu tertentu memasukkan preparat kedalam cairan aseton, *xylol*, alkohol 100%, alkohol 90%, alkohol 80%, alkohol 70% dan air.
- b) Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4.
- c) Inkubasi jaringan dengan tripsin 0,125 % pada temperatur 37 °C selama 5-10 menit, untuk membuka *masking antigen*.
- d) Jaringan diinkubasikan dengan H₂O₂ 0,5% dalam metanol selama 30 menit untuk menghilangkan pewarnaan endogen, dibiarkan pada temperatur ruangan.
- e) Cuci dengan air mengalir selama 1 menit, diikuti pencucian dengan akuadestilata.
- f) Tandai jaringan dan cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit.
- g) Inkubasi dengan 3% serum yang dilarutkan dalam BSA 1% selama 20 menit.

- h) Cuci dengan PBS pH 7,4 sebanyak dua kali, masing-masing selama 3 menit.
- i) Jaringan diinkubasi dengan monoklonal antibodi primer yaitu *murine monoclonal antibody* terhadap molekul IL-17 dari *mice* (Santa Cruz, US). Monoklonal antibodi dilarutkan dengan TRIS-PBS 1:200. Untuk jaringan seluas 1 cm² diperlukan 100 µL monoklonal antibodi. Inkubasi dilakukan selama 30 menit dalam ruang lembab.
- j) Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- k) Inkubasi jaringan dengan antibodi primer yaitu antibodi *anti murine* yang telah dibiotinilisasi (Dako Kit). Lama inkubasi 30 menit.
- l) Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- m) Inkubasi jaringan dengan streptavidin-biotin peroksidase (Dako Kit) selama 30 menit.
- n) Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- o) Inkubasi jaringan dengan substrat (Dako Kit) sampai timbul warna coklat pada jaringan, selama \pm 15 menit.
- p) Cuci jaringan dengan PBS pH 7,4 dua kali masing-masing selama 3 menit.
- q) Warnai jaringan dengan Hematoksilin.
- r) Cuci jaringan dengan air mengalir.
- s) Tutup jaringan dengan kaca penutup (*deck glass*) dan lem dengan entelan.
- t) Ekspresi molekul yang positif dengan monoklonal antibodi primer akan terlihat berwarna coklat dibawah mikroskop cahaya. Sel yang positif dihitung dalam persentase.

- u) Dari setiap pelaksanaan pewarnaan dibuat kontrol positif dan kontrol negatif.(Tomino, 2000; Purwanto, 2010).

G. Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan langkah-langkah sebagai berikut:

- a. Analisis deskriptif.
- b. Analisis normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians dengan *Levene's test*.
- c. Analisis komparasi. Data yang menyebar normal dan homogen, maka digunakan uji F Anova pada taraf kemaknaan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui efek pemberian NAS terhadap ekspresi IL-17 glomerulus dan tubulus interstisial dan fibrosis interstisial ginjal pada model nefritis lupus induksi pristan. Dilanjutkan dengan *Least Significant Difference (LSD) post-hoc test* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang berbeda.
- d. Apabila data tidak normal dan homogen digunakan uji *Kruskal-Wallis*, dilanjutkan uji *Man Whitney*.

BAB 4

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

5.1. Proses Analisis Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui pengaruh terapi NAS terhadap ekspresi IL-17 pada glomerulus dan tubulus interstisial dan tingkat fibrosis interstisial pada ginjal mencit nefritis lupus induksi pristana. Sebelum dilakukan uji hipotesis, terlebih dahulu dijelaskan deskripsi variabel penelitian yaitu ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosis interstisial pada kelompok kontrol, lupus nefritis, dan lupus nefritis+NAS.

Deskriptif obyek penelitian dimaksudkan untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap karakteristik obyek yang diteliti. Penelitian ini dilakukan terhadap 24 ekor mencit yang dikelompokkan menjadi tiga kelompok masing-masing kelompok berjumlah delapan ekor mencit sebagai obyek penelitian. Variasi dan perbedaan variabel yang dianalisis dalam ke tiga kelompok sampel itu meliputi ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosis interstisial.

Variabel-variabel penelitian dalam masing-masing kelompok sampel, setelah dijelaskan secara deskriptif yaitu nilai parameter rata-rata dan standar deviasinya, selanjutnya dilakukan pengujian normalitas data-data variabel penelitian tersebut untuk memastikan apakah data berdistribusi normal atau tidak berdistribusi normal. Pengujian normalitas data variabel ini digunakan untuk menentukan analisis statistik selanjutnya dalam menganalisis variabel penelitian

ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosis interstisial. Uji Normalitas data variabel pada penelitian ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk*.

Analisis penelitian ini diharapkan dapat mengidentifikasi terjadinya variasi atau perbedaan tiga rata-rata ekspresi IL-17 maupun tingkat fibrosis interstisial pada kelompok kontrol, lupus nefritis dan lupus nefritis+NAS. Dengan demikian penelitian ini menggunakan analisis statistik beda k rata-rata (dalam hal ini tiga rata-rata) untuk sampel yang independen atau analisis varians atau uji F.

Apabila hasil uji normalitas data variabel-variabel yang diteliti yaitu ekspresi IL-17 maupun tingkat fibrosis interstisial masing-masing kelompok sampel berdistribusi normal, maka uji variasi atau perbedaan beberapa rata-rata dapat menggunakan alat uji statistik parametrik yaitu *Analysis of Variance* (ANOVA) atau disebut juga Uji F. Selanjutnya, apabila variasi atau beda ketiga rata-rata atau rata-rata masing-masing variabel berdasarkan kelompok sampel itu signifikan (meyakinkan), analisis akan diteruskan dengan mencari perbedaan dua rata-rata antar kelompok sampel untuk masing-masing variabel dengan menggunakan uji lanjutan ANOVA yaitu *Post Hoc Test* dengan *LSD/ Bonferroni*. Namun apabila hasil uji normalitas data masing-masing variabel berdistribusi tidak normal maka uji variasi atau beda beberapa rata-rata dapat menggunakan uji statistik non parametrik *Kruskal Wallis*. Penelusuran lebih lanjut untuk menguji beda rata-rata antar masing-masing kelompok sampel dapat menggunakan analisis statistik non parametrik *Mann-Whitney*.

5.2. Deskripsi Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diduga dipengaruhi oleh terapi NAS terdiri dari dua variabel yaitu ekspresi IL-17 maupun tingkat fibrosis interstisial yang masing-masing bersifat kuantitatif dengan skala data rasio. Deskripsi variabel ekspresi IL-17 maupun tingkat fibrosis interstisial yang bersifat kuantitatif dibatasi pada pengungkapan nilai statistik rata-rata dan standar deviasi. Pengujian normalitas data atas variabel penelitian mendapatkan bahwa data-data variabel ekspresi IL-17 maupun tingkat fibrosis interstisial untuk kelompok kontrol, lupus nefritis, dan lupus nefritis+NAS ketiganya berdistribusi normal.

Deskripsi obyek penelitian berdasarkan nilai rata-rata dan standar deviasi variabel ekspresi IL-17 adalah sebagai berikut:

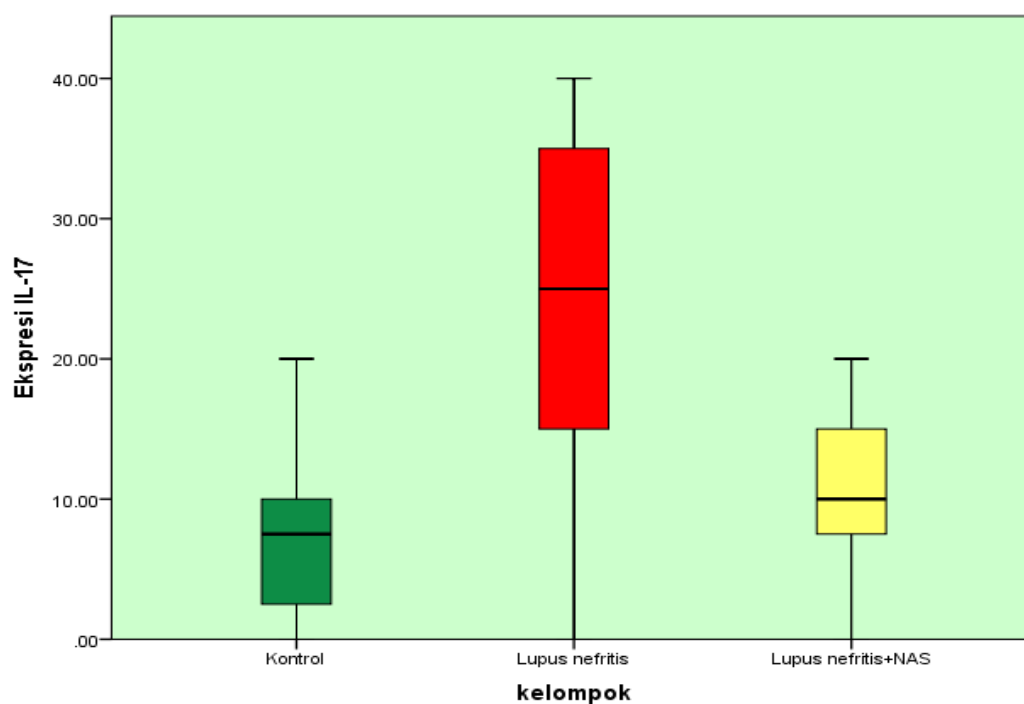
Tabel 5.1. Deskripsi dan Uji Normalitas ekspresi IL-17 per 100 sel netrofil

Kelompok	Rata-rata \pm SD (ekspresi IL-17 per 100 sel netrofil)	Uji Normalitas	
		Stat-SW	Sig
1. Kontrol	7,5 \pm 6,6	0,899	0,283
2. lupus nefritis	23,8 \pm 14,1	0,934	0,557
3. lupus nefritis+NAS	10,6 \pm 6,8	0,882	0,195

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : * Signifikan pada derajat signifikansi 5%.

Berdasarkan deskripsi variabel ekspresi IL-17 di atas, nampak bahwa mencit yang diberikan perlakuan lupus nefritis memiliki rata-rata ekspresi IL-17 lebih tinggi dibandingkan pada kelompok kontrol. Pemberian NAS mampu menurunkan ekspresi IL-17. Perbedaan rata-rata ekspresi IL-17 antar kelompok sampel itu dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 5.1. Perbandingan Nilai Rata-rata ekspresi IL-17 per 100 sel netrofil antar Kelompok Sampel

Deskripsi rinci nilai rata-rata dan standar deviasi serta hasil uji normalitas data masing-masing kelompok untuk variabel tingkat fibrosis interstisial adalah sebagai berikut:

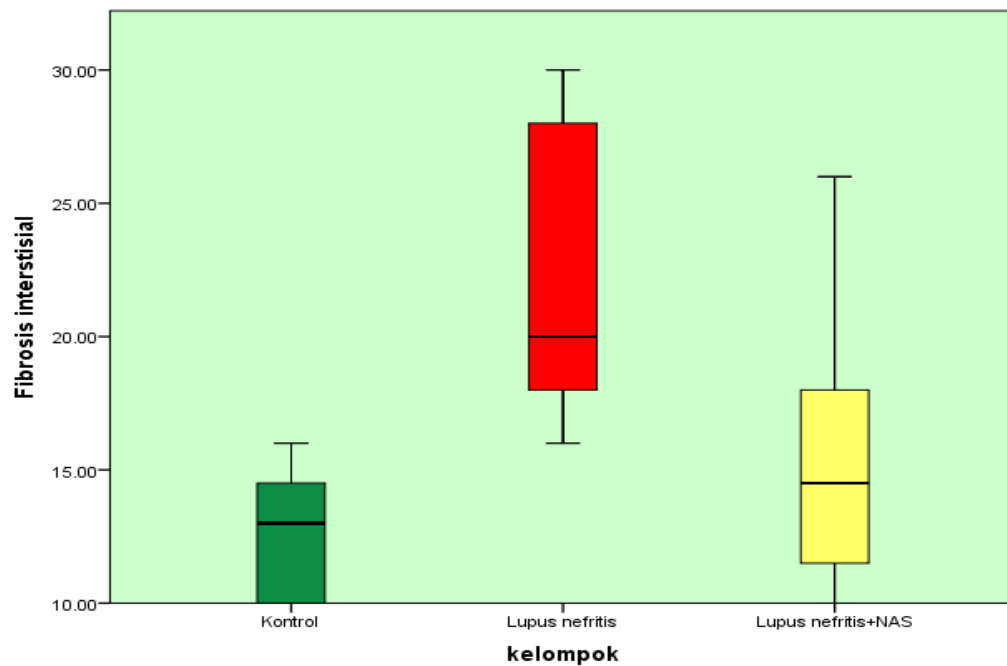
Tabel 5.2. Deskripsi dan Uji Normalitas Variabel tingkat fibrosis interstisial

Kelompok	Rata-rata \pm SD	Uji Normalitas	
		Stat-SW	Sig
1. Kontrol	12,6 \pm 2,5	0,835	0,067
2. lupus nefritis	23,3 \pm 5,7	0,855	0,108
3. lupus nefritis+NAS	15,5 \pm 5,4	0,899	0,280

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : *Signifikan pada derajat signifikansi 5%.

Berdasarkan deskripsi variabel tingkat fibrosisinterstisial di atas, pemberian NAS menurunkan rata-rata tingkat fibrosisinterstisial dibandingkan pada kelompok lupus nefritis. Perbedaan rata-rata tingkat fibrosisinterstisial antar kelompok sampel itu dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 5.2. Perbandingan Nilai Rata-rata tingkat fibrosisinterstisialantar Kelompok Sampel

Dengan demikian distribusi data variabel ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosisinterstisial sudah dideskripsikan secara ringkas dan sudah dilakukan pengujian normalitas data terhadap variabel tersebut dan hasilnya semua distribusi data kedua variabel penelitian itu berdistribusi normal.

5.3. Analisis Pengaruh NAS terhadap ekspresi IL-17 dan tingkat fibrosisinterstisialpada Mencit yang Terinduksi Pristan

Langkah pertama menguji variasi atau beda k rata-rata berdasarkan kelompok sampel untuk variabel IL-17. Distribusi data variabel IL-17 semua

kelompok sampel berdistribusi normal, maka pengujian variasi atau beda 3 rata-rata itu menggunakan ANOVA atau uji F. Hasil pengujian ANOVA untuk variabel IL-17 adalah sebagai berikut:

Tabel 5.3. Perbedaan rata-rata ekspresi IL-17 per 100 sel netrofil dalam Kelompok Sampel.

Kontrol		lupus nefritis		lupus nefritis+NAS	
Rata-rata	Std	Rata-rata	Std	Rata-rata	Std
7,5	6,6	23,8	14,1	10,6	6,8
Nilai F = 6,216		Signifikansi = 0,008**		Signifikan	

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : **) Signifikan pada derajat signifikansi 1 persen.

Hasil analisis variasi atau beda 3 rata-rata di atas menunjukkan bahwa perbedaan 3 rata-rata variabel IL-17 tersebut menghasilkan nilai F hitung = 6,216 dengan tingkat signifikansi sebesar 0,008 yang berarti beda 3 rata-rata itu signifikan atau meyakinkan dengan derajat signifikansi $p < 0,01$. Hal itu berarti beda rata-rata variabel IL-17 pada kelompok kontrol, lupus nefritis, dan lupus nefritis+NAS benar-benar berbeda secara meyakinkan. Jika dibandingkan dengan rata-rata IL-17 pada kelompok kontrol, kelompok lupus nefritis memiliki kecenderungan rata-rata IL-17 lebih tinggi (meningkat), kemudian rata-rata IL-17 pada kelompok lupus nefritis+NAS memiliki rata-rata lebih rendah dibandingkan kelompok lupus nefritis atau berarti ekspresi IL-17 itu dapat diturunkan dengan pemberian NAS.

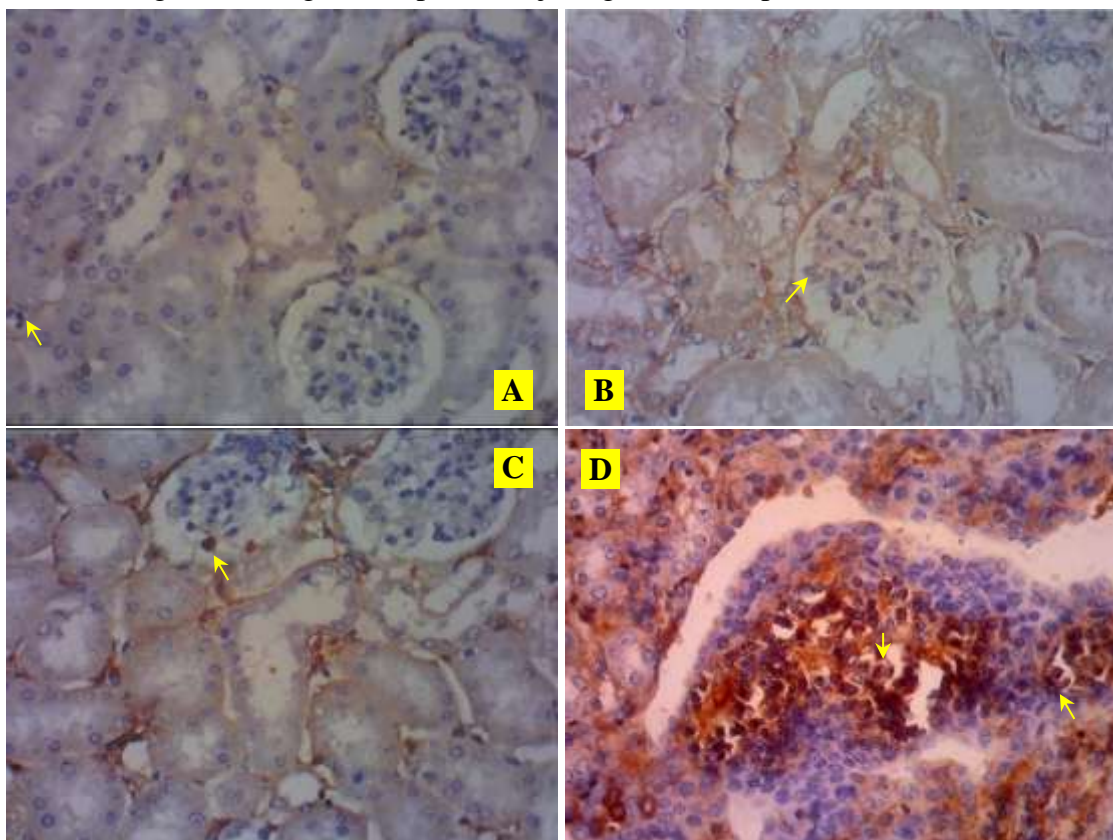
Hasil penelusuran beda dua rata-rata variabel IL-17 antar kelompok sampel dapat dijelaskan dengan tabel sebagai berikut:

Tabel 5.4.Perbedaanrata-rata ekspresi IL-17 per 100 sel netrofil antar Kelompok Sampel

Kelompok	Beda Rata-rata	Signifikansi
Kontrol vs lupus nefritis	-16,25	0,010*
lupus nefritis vs lupus nefritis+NAS	13,13	0,042*
Kontrol vs lupus nefritis+NAS	-3,13	1,000

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : *) Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.



Gambar 5.3. Perbandingan gambaran protein IL-17 yang diekspresikan sel netrofil masing-masing kelompok.

Ekspresi protein IL-17 pada membran di sel-sel netrofil nampak berwarna coklat perak (panah). A: kelompok kontrol; B: kelompok Lupus nefritis; C: kelompok Lupus nefritis+NAS (Pewarnaan immunohistokimia; pembesaran 400x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel); D: Ekspresi IL-17 pada membran sel netrofil (Pewarnaan immunohistokimia; pembesaran 1000x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel)

Hasil analisis beda 2 rata-rata sampel independen menggunakan penelusuran *Post Hoc Test Benferronidiatas* menunjukkan bahwa uji terhadap variabel IL-17 antara kelompok Kontrol dan lupus nefritis signifikan pada derajat signifikansi sebesar 0,010 ($p < 0,05$). Hal itu dapat dikatakan bahwa pada mencit kelompok lupus nefritis mempunyai rata-rata ekspresi IL-17 lebih tinggi (meningkat) secara meyakinkan dibandingkan kelompok kontrol. Setelah diberikan terapi NAS maka rata-rata ekspresi IL-17 lebih rendah (mengalami penurunan) dibandingkan pada kelompok lupus nefritis dengan tingkat signifikansi sebesar 0,042 ($p < 0,05$). Dengan demikian hipotesis pertama yang menyatakan bahwa: “*Pemberian N-asetilsistein menurunkan ekspresi IL-17 pada mencit lupus nefritis induksi pristana*” benar-benar dapat terbukti secara meyakinkan. Pemberian NAS mampu menurunkan ekspresi IL-17.

Langkah kedua menguji variasi atau beda k rata-rata berdasarkan kelompok sampel untuk variabel tingkat fibrosis interstisial. Distribusi data tingkat fibrosis interstisial secara keseluruhan masing-masing kelompok data berdistribusi normal, maka pengujian variasi atau beda 3 rata-rata itu menggunakan ANOVA atau uji F. Hasil pengujian ANOVA untuk variabel tingkat fibrosis interstisial adalah sebagai berikut:

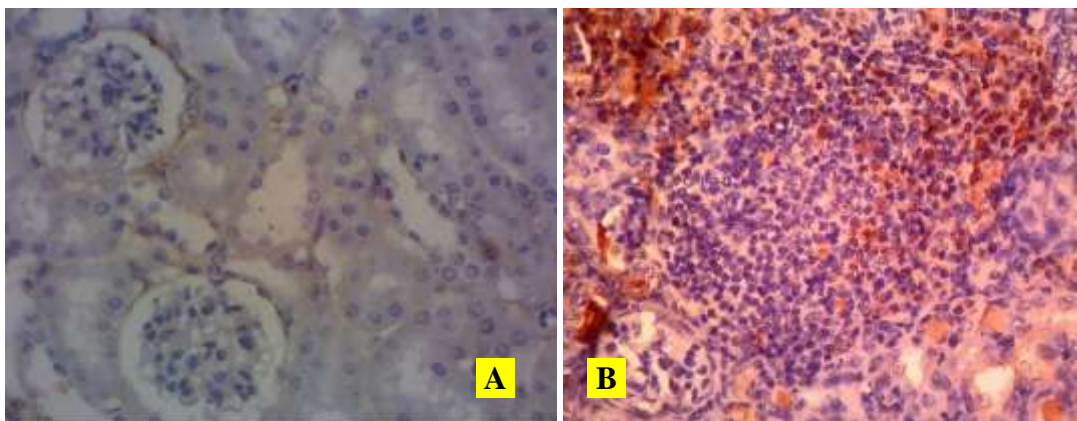
Tabel 5.5. Perbedaan rata-rata tingkat fibrosis interstisial menurut Kelompok Sampel.

Kontrol		lupus nefritis		lupus nefritis+NAS	
Rata-rata	Std	Rata-rata	Std	Rata-rata	Std
12,6	2,5	23,3	5,7	15,5	5,4
Nilai F = 8,627		Signifikansi = 0,002**		Signifikan	

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : **) Signifikan pada derajat signifikansi 1 persen.

Hasil analisis variasi atau beda 3 rata-rata di atas menunjukkan bahwa perbedaan 3 rata-rata variabel tingkat fibrosis interstisial tersebut menghasilkan nilai F hitung = 8,627 dengan tingkat signifikansi sebesar 0,002 yang berarti beda 3 rata-rata itu signifikan atau meyakinkan dengan derajat signifikansi $p < 0,01$. Hal itu berarti beda rata-rata variabel tingkat fibrosis interstisial pada kelompok kontrol, lupus nefritis, dan lupus nefritis+NAS benar-benar berbeda secara meyakinkan. Jika dibandingkan dengan rata-rata tingkat fibrosis interstisial pada kelompok kontrol, kelompok lupus nefritis memiliki kecenderungan rata-rata tingkat fibrosis interstisial lebih tinggi (meningkat), kemudian rata-rata tingkat fibrosis interstisial pada kelompok lupus nefritis+NAS memiliki rata-rata lebih rendah (menurun) dibandingkan kelompok lupus nefritis atau berarti tingkat fibrosis interstisial itu dapat diturunkan dengan pemberian NAS.



Gambar 5.4. Perbandingan gambaran tingkat fibrosis interstisial.

A: ginjal normal; B: fibrosis dan inflamasi interstisial

(Pewarnaan Hematoksilin eozin; pembesaran 1000x-Olympus BX 50 Model BX-50F-3. Pentax Optio 230 Digital Camera 2.0 Megapixel).

Hasil penelusuran beda dua rata-rata variabel tingkat fibrosisinterstisial antar kelompok sampel dapat dijelaskan dengan tabel sebagai berikut:

Tabel 5.6. Perbedaan rata-rata tingkat fibrosisinterstisial antar kelompok sampel.

Kelompok	Beda Rata-rata	Signifikansi
Kontrol vs lupus nefritis	-9,63	0,002**
Lupus nefritis vs lupus nefritis+NAS	6,75	0,030*
Kontrol vs lupus nefritis+NAS	-2,88	0,721*

Sumber: Data Primer 2015, diolah.

Keterangan : *) Signifikan pada derajat signifikansi 5 persen.

**) Signifikan pada derajat signifikansi 1 persen.

Hasil analisis beda 2 rata-rata sampel independen menggunakan penelusuran *Post Hoc Test Benferronidiatas* menunjukkan bahwa uji terhadap variabel tingkat fibrosisinterstisial antara kelompok Kontrol dan lupus nefritis signifikan pada derajat signifikansi sebesar 0,002 ($p < 0,01$). Hal itu dapat dikatakan bahwa pada mencit kelompok lupus nefritis rata-rata tingkat fibrosisinterstisial lebih tinggi (meningkat) secara meyakinkan dibandingkan kelompok kontrol. Setelah diberikan terapi NAS maka rata-rata tingkat fibrosisinterstisial lebih rendah (mengalami penurunan) dibandingkan pada kelompok lupus nefritis dengan tingkat signifikansi sebesar 0,030 ($p < 0,05$). Dengan demikian hipotesis kedua yang menyatakan bahwa: “*Pemberian N-asetilsistein menurunkantingkat fibrosisinterstisial pada mencit lupus nefritis induksi pristan*” benar-benar dapat terbukti secara meyakinkan. Pemberian NAS mampu menurunkantingkat fibrosisinterstisial.

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini didapatkan suatu proses sesuai dalam tahapan proses penyakit yang dikenal dengan *initial stage (Incubation period/Sub clinical)* (Purwanto, 2010). Dimana berdasarkan prinsip **ontologi**, injeksi pristan pada mencit BALB/c secara intraperitoneal dapat mengembangkan respons inflamasi lokal (lipogranuloma) dan artritis erosif menyerupai rheumatoid arthritis (RA) dan juga dapat menginduksi produksi autoantibodi dan manifestasi klinis SLE (Reeves dkk., 2009). Mencit yang diinjeksi pristan memperlihatkan manifestasi klinis dari lupus, termasuk artritis, glomerulonefritis dan kapillaritis paru. Glomerulonefritis yang terjadi sebagai akibat dari adanya proses deposit kompleks imun yaitu IgG dan komplemen di glomerulus, proliferasi sel dan proteinuria (Reeves dkk., 2009) yang pada akhirnya terjadi kerusakan ginjal. Terjadinya kerusakan pada jaringan ginjal pada penelitian ini dapat dideteksi pada tingkat molekuler yaitu perubahan ekspresi IL-17 pada netrofil glomerulus maupun interstisial dan terjadinya peningkatan derajat fibrosis interstisial ginjal yang dilakukan pemeriksaan imunobiologik dengan metode imunohistokimia maupun histopatologi.

Injeksi pristan akan menyebabkan tersekresinya autoantibodi, selanjutnya akan terbentuk kompleks atigen-autoantibodi. Kompleks atigen-autoantibodi yang berada di sirkulasi akhirnya akan terdisposisi pada sel target, termasuk sel mesangial, podosit, sel tubulus dan sel endotel di glomerulus. Kompleks ini akan menyebabkan terjadinya fibrosis interstisial pada ginjal, selanjutnya menyebabkan kerusakan pada ginjal dan terjadilah mikroalbuminuria. Sel-sel di ginjal yang rusak akibat pemberian pristan akan membentuk *debris*. *Debris* akan

mengaktifkan makrofag, lewat TLR-4, sehingga makrofag akan teraktivasi dan mensekresikan maupun mengekspresikan sitokin proinflamasi maupun memicu proses apoptosis. Apoptosis sel ginjal yang diinduksi pristan dikaitkan dengan gen seperti Bcl-2, Fas dan Fas-ligan, p53, dan caspase, serta Angiotensin II (Ang II), NO, TGF- β 1, EGF, dan makrofag juga terlibat (Yoon dan Yang, 2009; Xiao dkk., 2013). Selain itu, pemberian pristan menyebabkan populasi sel B akan *switch* ke sel memori yang akan meningkatkan ekspresi TLR7 dan hiperresponsif terhadap ligan TLR7 dan sel apoptosis. Populasi sel B memori ini mengandung sel-sel B yang tidak mensekresi immunoglobulin dalam kondisi istirahat, tetapi dapat didorong oleh ligan TLR7 untuk menghasilkan autoantibodi IgG anti-U1A (RNP) melalui aktivasi NF κ B dan p38 MAPK (Shuhong dkk., 2015).

Injeksi pristan i.p. akan mengaktivasi NF κ B dan p38 MAPK sehingga terjadi peningkatan produksi TGF- β . TGF- β akan merangsang sel target, yaitu sel fibroblas, sel mesangial, podosit, sel tubulus dan sel endotel. Aktivasi sel-sel target ini akan memicu terbentuknya ECM. Sel fibroblas akan mengekspresikan kolagen tipe-I dan akhirnya menyebabkan terjadinya fibrosis interstisial pada ginjal (Purwanto, 2010; Loeffler dan Wolf, 2013). Proses ini sesuai dengan tahap *emergence stage* dalam tahapan proses penyakit (Purwanto, 2010).

Induksi pristan selain meningkatkan ekspresi protein TGF- β 1, juga menyebabkan aktivasi NADPH *oxidase* dan peningkatan produksi ROS dalam neutrofil. Molekul yang tereduksi dan teroksidasi ini memiliki peran yang berbeda dalam sinyal ekstraseluler dan regulasi respon imun, dimediasi oleh sinyal melalui RAGE dan/atau TLR, yang pada akhirnya akan menyebabkan

terjadinya mikroalbuminuria. TLR telah diidentifikasi sebagai terapitarget pada penyakit autoimun, termasuk lupus nefritis. Semakin banyak bukti menyatakan bahwa TLR4 ekstraseluler dan TLR9 intraseluler terlibat dalam penyakit autoimunitas dan auto-inflamasi. Pada pasien dengan SLE aktif, ekspresi TLR9 dan TLR7 pada sel B meningkat. Selain itu, peningkatan ekspresi TLR9 dan TLR7 berkorelasi dengan cedera ginjal (Summers dkk., 2010; Shuhong dkk., 2015). Setelah 6 hari injeksi pristin, maka produksi IL-17 meningkat secara signifikan utamanya diproduksi oleh neutrofil dan makrofag. Selain itu juga akan merangsang TNF α lokal, sehingga akan menyebabkan endotel mengekspresikan e-selektin yang diperlukan untuk mengikat PMN. PMN kemudian akan mengekspresikan MMP-9. MMP-9 selanjutnya mendegradasi kolagen yang diekspresikan oleh sel fibroblas. Dalam keadaan normal sesuai dengan hukum homeostasis, terjadi keseimbangan pengaruh TGF- β 1 dan MMP-9. TGF- β 1 juga menghambat ekspresi MMP-9 yang diekspresikan oleh PMN. Pada penelitian ini injeksi pristin diharapkan akan menyebabkan TGF- β 1 lebih dominan daripada MMP-9, sehingga terjadi interstitial fibrosis. IL-1 β akan merangsang endotel untuk mengekspresikan ICAM, selanjutnya ICAM akan mengikat monosit kemudian monosit akan masuk ke jaringan dan akan berubah menjadi makrofag. Makrofag yang bertambah banyak akan menyebabkan meningkatnya proses ekspresi sitokin yang berakibat pada bertambah beratnya fibrosis (Gameson dan Reeves, 2007; Purwanto, 2010). Tahap ini sesuai dengan *active stage*.

Pemberian kombinasi NAS pada mencit lupus nefritis pada penelitian ini, NAS berperan sebagai anti ROS, sehingga kerusakan sel (debris) berkurang,

akibatnya rangsangan terhadap makrofag lewat TLR-4, TLR-7 dan TLR-9 berkurang pula. Akibatnya ekspresi IL-17 oleh netrofil juga berkurang, kondisi tersebut akan berperan dalam memperbaiki keadaan *imbalance* tersebut.

Berdasarkan pendekatan prinsip **epistomologi**, penelitian ini ekspresi IL-17 di netrofil ginjal pada kelompok mencit yang diinduksi pristan sebagai agen nefrotoksik terlihat lebih tinggi daripada mencit normal sebagai kontrol. Peningkatan ekspresi IL-17 terjadi karena pemberian pristan akan menyebabkan (a) stimulasi mediator inflamasi, (b) peningkatan produksi autoantibodi, (c) peningkatan deposisi kompleks imun di glomerulus, (d) peningkatan TGF- β 1, (e) meningkatnya imunogenisitas dan (f) apoptosis yang meningkat (Reeves dkk., 2009; Xiao dkk., 2013; Vahed dkk., 2015).

Proses terjadinya fibrosis ginjal melalui empat fase, yaitu *priming* (respons inflamasi terlokalisir), *activation* (aktivasi dan perekrutan sel-sel memproduksi matriks), *execution* (akumulasi protein matriks), dan *progression* (hilangnya sel dan fungsi ginjal). Terjadinya cedera sel epitel tubular secara langsung atau rangsangan seluler memicu respons pro-inflamasi yang melibatkan aktivasi respons imun bawaan dan produksi faktor pertumbuhan dan sitokin, yang mengakibatkan perekrutan sel inflamasi. Akumulasi lokal sitokin profibrotik meningkatkan aktivasi dan perekrutan sel matriks yang memproduksi dari sumber yang berbeda. Akumulasi protein matriks ekstraselular dalam fibrosis ginjal bersamaan dengan hilangnya tubular dan sel-sel vaskular, akumulasi limfosit dan makrofag, dan akuisisi fenotipe selular mesensimal oleh sel tubular dan endotel, yang berhubungan dengan hilangnya fungsi ginjal (Chuang dkk., 2013; Duffield,

2014). Pemberian kombinasi NAS pada lupus nefritis menurunkan ekspresi IL-17 dibandingkan kelompok lupus nefritis yang hanya mendapatkan induksi pristan saja. Telah diterima secara umum bahwa tingkat fibrosis adalah keseimbangan antara sintesis dan degradasi kolagen, adanya penurunan aktivitas protease dapat mengakibatkan fibrosis. Saat ini, adanya fibrosis karena penurunan aktivitas protease. Pada gilirannya, fibrosis ginjal bermanifestasi sebagai akumulasi kolagen dalam ginjal (Racca dkk., 2015). Kandungan sulfur-hidril endogen berperan penting dalam penyangga metabolik yang digunakan sel untuk melawan kekuatan oksidatif stres. NAS yang mengandung sulfur-hidril berperan sebagai antioksidan poten. Sulfur-hidril tersebut bertindak sebagai prekursor sintesis glutathione yang akan menghasilkan detoksifikasi substrat asing (Finamor dkk., 2014; Li dkk., 2015). Hasil ini sejalan dengan penelitian Zhi-Wei dkk (2013), pentingnya terapi NAC untuk SLE tercermin dari 1) tercapainya perbaikan klinis dua skor aktivitas penyakit dalam waktu 3 bulan; 2) berkurang kelelahan, yang dianggap sebagai gejala yang paling melumpuhkan dalam sebagian besar pasien SLE; 3) tidak adanya efek samping yang signifikan; dan 4) keterjangkauan obat ini.

Berdasarkan prinsip **axiologi**, secara keseluruhan **manfaat** hasil penelitian ini adalah kombinasi lupus nefritis+NAS dapat mencegah/mengurangi efek nefrotoksik pada ginjal. NAS merupakan suatu senyawa yang mengandung tiol dengan efek antioksidan dan antiinflamasi. Efek antioksidan NAS dapat terjadi secara langsung melalui interaksi dengan ROS elektrofilik maupun sebagai prekursor glutathione, suatu antioksidan yang dapat melindungi sel dari stres

oksidatif(De Backer dkk., 2013).Stres oksidatif terjadi ketika produksi ROS berlebihan melebihi kapasitas metabolisme dari sistem pertahanan antioksidan, sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan ginjal. Terapi NAS akan menghambat ekspresi dan aktivitas enzim antioksidan seperti SOD, katalase dan glutathion peroksidase. Dengan demikian, suplemen NAS pada lupus nefritis dapat mengurangi efek nefrotoksik pada ginjal, melalui penurunan ekspresi IL-17 dan derajat fibrosis interstisial.

Nilai-nilai kebaruan dari penelitian ini adalah (Purwanto, 2010):

- 1) **Solusi baru.** Kerangka konsep dan hasil penelitian ini merupakan **solusi baru** dengan mengkombinasikan penggunaan NAS pada lupus nefritis akan menurunkan progresivitas kerusakan ginjal, melalui penurunan oksidatif stres dan inflamasi yang dideteksi dari penurunan ekspresi IL-17 dan derajat fibrosis interstisial. Penurunan progresivitas efek nefrotoksik pada lupus nefritis akan dapat mempertahankan fungsi ginjal, sehingga menghindari terjadinya sindrom uremia.
- 2) **Strategi baru.** Dari hasil penelitian ini akan memberikan suatu informasi, bahwa dalam penatalaksanaan lupus nefritis seharusnya dikombinasikan NAS dengan dosis yang tepat sehingga efek nefroprotektif maksimal untuk mencegah atau mengurangi terjadinya morbiditas dan mortalitas akibat komplikasi (nefrotoksik) yang ditimbulkan lupus nefritis.
- 3) **Perspektif baru.** Hasil penelitian ini dapat digunakan, dikembangkan lebih lanjut dalam usaha mengurangi komplikasi SLE khususnya pada ginjal. *Perspektif baru* dapat digunakan sebagai dasar/acuan dalam

pengembangan penggunaan obat-obatan nefroprotektif baru yang berdasarkan patogenesis biomolekuler. Penelitian lanjutan dapat dipergunakan obat-obat nefroprotektif lainnya (sistein, glutation, BMP-7, sel punca).

- 4) **Kondisi baru.** Hasil penelitian ini menginformasikan kondisi penderita menjadi lebih baik, bila dalam terapi lupus nefritis diberikan NAS sehingga komplikasi bisa dikurangi, akibatnya kualitas hidup penderita menjadi lebih baik. Hal tersebut diatas akan membuat *kondisi baru* bagi penderita SLE yang telah terjadi komplikasi lupus nefritis.

Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini masih ada keterbatasannya, yaitu

- a) Pemberian NAS pada penelitian ini, kami gunakan dosis terapi maksimal (sesuai definisi operasional yaitu secara peroral dengan dosis 4,7mg/hari [setara dengan dosis manusia 1.800 mg]) sehingga diperlukan pemberian variasi dosis untuk mendapatkan efek optimal serta penggunaan pemberian NAS melalui jalur lain (intravena).
- b) Proses ekspresi IL-17 dan derajat fibrosis interstisial sampai minggu ke-8 masih progresif. Hal ini terbukti, pada penelitian didapatkan adanya peningkatan kuantitas variabel pada minggu ke-8 yang lebih tinggi. Sementara penelitian kami dihentikan pada minggu ke-8 (sesuai dengan kerangka operasional penelitian).

- c) Pada penelitian kami memberikan obat nefroprotektif (NAS) memang bermanfaat, tetapi akan lebih baik bila dibandingkan dengan obat-obatan nefroprotektif lainnya.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang dilakukan, maka dapat diambil simpulan sebagai berikut:

1. Pemberian N-Asetilsistein secara bermakna menurunkan ekspresi IL-17 di glomerulus pada mencit lupus nefritis.
2. Pemberian N-Asetilsistein secara bermakna menurunkan fibrosis interstisial pada mencit lupus nefritis.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka ada beberapa saran, yaitu:

1. Pemberian NAS pada penelitian kami menggunakan dosis terapi maksimal, sehingga perlu didapatkan dosis optimal karena 30% melalui *renal clearance* dan perlu penggunaan melalui jalur lain. Penelitian ini menggunakan peroral, bioavailabilitas oral rendah (4-10%) tergantung apakah yang diukur adalah total asetilsistein atau bentuk reduksinya. Bioavailabilitas oral yang rendah disebabkan oleh metabolisme dalam dinding usus dan *first-pass* metabolisme di hati.
2. Proses ekspresi IL-17 dan derajat fibrosis interstisial sampai minggu ke-8 masih progresif. Sementara penelitian kami dihentikan pada minggu ke-8 (sesuai dengan kerangka operasional penelitian), sehingga penelitian

sebaiknya dilanjutkan dengan waktu observasi yang lebih lama (12-16 minggu).

3. Pada penelitian kami pemberian obat nefroprotektif (NAS) memang bermanfaat, tetapi akan lebih baik bila dibandingkan dengan obat-obatan nefroprotektif lainnya. Sehingga dapat dilakukan penelitian dengan obat nefroprotektif lain yang mungkin lebih bermanfaat (sistein, glutathione, BMP-7, sel punca).

DAFTAR PUSTAKA

- Appel GB, Radhakrishnan J, D'Agati V. 2007. Secondary glomerular disease. In *The Kidney*. Edited by Brenner BM. 8th edition. Philadelphia, PA: Saunders. Pp.1067-1148.
- Askanase A, Shum K, Mitnick H. 2012. Systemic lupus erythematosus: an overview. *Soc Work Health Care*. 51(7):576-86.
- Bertsias G, Gordon C, Boumpas DT. 2008. Clinical trials in SLE: lessons learned from the past as we proceed to the future – the EULAR recommendations for the management of SLE and the use of end-points in clinical trials. *Lupus*, 17:437-442.
- Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. 2012. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev*. 12(2):174-94.
- Borrás C, Esteve JM, Viña JR, Sastre J, Viña J, Pallardó FV. 2004. Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*. 279(33):34332-5.
- Chen DY, Chen YM, Wen MC, Hsieh TY, Hung WT, Lan JL. 2012. The potential role of Th17 cells and Th17-related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis. *Lupus*. 21:1385–1396.
- Chowdhary VR, Grande JP, Luthra HS, David CS. 2007. Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane-induced lupus. *Rheumatology (Oxford)*. 46(9):1405-10.
- Chuang PY, Menon MC, He JC. 2013. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. *J Mol Med (Berl)*. 91(5): 549–559.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T et al. 2001. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *FASEB J*. 15(7): 1187-200.
- De Backer J, Vos W, Van Holsbeke C, Vinchurkar S, Claes R, Parizel PM, De Backer W. Effect of high-dose N-acetylcysteine on airway geometry, inflammation, and oxidative stress in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2013;8:569-79.

- Duffield JS. 2014. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest.* 124(6): 2299–2306.
- Eroschenko VP. 2000. *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correltions.* 9 ed. Lippincort Williams & Wilkins Inc., U.S.A. pp 246-251.
- Espeli M, Bokers S, Giannico G, Dickinson HA, Bardsey V, Fogo AB, Smith KGC. 2011. Local renal autoantibody production in lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22:296–305.
- Gameson R, Reeves WB. 2007. TNF- α Mediates Chemokine and Sitokine Expression and Renal Injury in Cesplation Nephrotoxcity. *J. Clin Invest* 110: 835-842.
- Gottschalk TA, Tsantikos E, and Hibbs ML.2015. Pathogenic Inflammation and Its Therapeutic Targeting in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 6: 550.
- Guntur A. 2006. *Perspektif masa depan Immunologi-Infeksi.* UNS Press, Solo. Hal:172-6.
- Guyton AC, Hall JE. 1995. *Textbook Of Medical Physiology.* W B Saunders Co.3:192-5.
- HansenJM, WatsonWH, JonesDP. 2004. Compartmentation of Nrf-2 Redox Control: Regulation of Cytoplasmic Activation by Glutathione and DNA Binding by Thioredoxin-1. *Toxico Sci.* 82 (1): 308-17.
- Hayakawa H, Ishibashi T, Sekiguchi M. 2003.A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides. *EMBO.* 4(5): 479-83.
- Heloisa M, Shimizu M, Coimbra TM, De Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. 2005. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *International Society of Nephrology.* 2208–17.
- Huang XR, Chung AC, Wang XJ, Lai KN, Lan HY. 2008. Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295:F118-27.
- Isbagio H, Albar Z, Kasjmir YI, Setyohadi B. 2006. *Lupus Eritematosus Sistemik.* Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II, Edisi IV, hal: 1224-1230.
- Iwata Y, Furuichi K, Kaneko S, Wada T. 2011. The role of cytokine in the lupus nephritis.*J Biomed Biotechnol.* 2011:594809.


- Jiang T, Tian F, Zheng H, Whitman SA, Lin Y, Zhang Z, et al. 2014. Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF- κ B-mediated inflammatory response. *Kidney Int.* 85(2): 333–343.
- Kolls JK, Lindén A. 2004. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21(4): 467–76.
- Kuby J, Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. *Kuby immunology*. San Francisco: W.H. Freeman. pp. 396.
- Lan HY. 2011. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 7(7):1056–67.
- Lech M, Anders HJ. 2013. The pathogenesis of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24:1357–1366.
- Loeffler I, Wolf G. 2013. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 0: 1–9.
- Marcello M, Suliman M, Silva M, Chinaglia T, Marchioro J, Shirley Y et al. 2010. Effect of oral N Acetylsisteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients, a placebo controlled study. *Perit Dial Int.* 30(3):336–42
- Maroz N, Segal MS. 2013. Lupus nephritis and end-stage kidney disease. *Am. J. Med. Sci.* 346:319–323.
- McPhee SJ, Papadakis MA, Current Medical Diagnosis and Treatment 2011, McGraw Hill Lange, 2011:p 878–85.
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.* 361(9): 888–98.
- Mohamed R, Jayakumar C, Ramesh G. 2013. Chronic administration of EP4-selective agonist exacerbates albuminuria and fibrosis of the kidney in streptozotocin-induced diabetic mice through IL-6. *Lab Invest.* 93(8):933–45.
- Motazed R, Colville-Nash P, Kwan JTC, Dockrell MEC. 2008. BMP-7 and Proximal Tubule Epithelial Cells: Activation of Multiple Signaling Pathways Reveals a Novel Anti-fibrotic Mechanism. *Pharmaceutical Research* 25(10):2440–2446.
- Nolin T, Ouseph R, Himmelfarb J, McMenamin M, Ward R. 2010. Multiple dose pharmacokinetic and pharmacodynamics of N-acetylsisteine in patients with end stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5:172–82

- Oikawa S. 2005. Sequence-specific DNA damage by reactive oxygen species: Implications for carcinogenesis and aging. *Environ Health Prev Med.* 10(2): 65–71.
- Peliçari KdeO, Postal M, Sinicato NA, Peres FA, Fernandes PT, Marini R, et al. 2015. Serum interleukin-17 levels are associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo).* 70(5):313-7.
- Perry D, Sang A, Yin Y, Ying-Yi Z, Morel L. 2011. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* Volume 2011 (2011), Article ID 271694, 19 pages
- Purwanto B. 2010. *Kajian ekspresi $tgf-\beta 1$, $mmp-9$, kolagen tipe-I, kolagen tipe-IV, glomerulosklerosis, interstisial fibrosis, albuminuri pada kejadian nefrotoksik doxorubicin dan nefroprotektif pentoxifylin dengan hewan coba mencit galur swiss jantan.* Disertasi. Program Pascasarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Qu H, Bian W, Xu Y. 2014. A novel NF- κ B inhibitor, DHMEQ, ameliorates pristane-induced lupus in mice. *Exp Ther Med.* 8(1):100-104.
- Rahman A, Isenberg DA. 2008. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 358(9):929–939.
- Ranganathan P, Jayakumar C, Ramesh G. 2013. Proximal tubule-specific overexpression of netrin-1 suppresses acute kidney injury-induced interstitial fibrosis and glomerulosclerosis through suppression of IL-6/STAT3 signaling. *Am J Physiol Renal Physiol.* 304(8):F1054-65.
- Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. 2009. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol* 30(9):455–64.
- Robbins and Cotran. 2005. *General Pathology.* Basic Pathology Disease. EGC.I:20-43
- Sastroasmoro S, Ismael S. 2011. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis.* Edisi ke-4. CV. Sagung Seto. Jakarta. Indonesia.
- Schmidt T, Paust HJ, Krebs CF, Turner JE, Kaffke A, Bennstein SB, et al. 2015. Function of the Th17/interleukin-17A immune response in murine lupus nephritis. *Arthritis Rheumatol.* 67:475–487.


- Schwartz MM. 2007. The pathology of lupus nephritis. *Semin Nephrol.* 27(1):22–34.
- Shuhong H, Zhuang H, Xu Y, Lee P, Li Y, Wilson JC, Vidal O, et al. 2015. Maintenance of autoantibody production in pristane-induced murine lupus. *Arthritis Res Ther.* 17: 384.
- Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. 2002. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J. Immunol* 169(2): 642–6.
- Steel RGD and Torrie JH. 1980. *Principal and Procedures of Statistic.* Biometrical Approach. 2nd ed. Sao Paulo Singaopre Sydney Tokyo McGraw-Hill Book Company: 68 – 120.
- Sterner RM, Hartono SP, Grande JP. 2014. The Pathogenesis of Lupus Nephritis. *J Clin Cell Immunol.* 5(2):205.
- Summers SA, Odobasic D, Khouri MB, Steinmetz OM, Yang Y, Holdsworth SR, Kitching AR. 2014. Endogenous interleukin (IL)-17A promotes pristane-induced systemic autoimmunity and lupus nephritis induced by pristane. *Clin Exp Immunol.* 176(3):341-50.
- Tamaki K, Seiya O, Takashi A. 1994. TGF- β in Glomerulosclerosis and Interstitial Fibrosis, of Andriamycin Nephropathy. *Kidney International* 45:525 – 536.
- Tewthanom K, Janwitayanujit S, Totemchockcyakarn K, Panomvana Na Ayudhya D. 2010. The effect of high dose of N-acetylcysteine in lupus nephritis: a case report and literature review. *J Clin Pharm Ther.* 35(4):483-5.
- Tomino Y. 2000. *Enzyme Antibody Method.* In Laboratory Techniques in Renal Cell and Molecular Biology. Bunkodo Co., Ltd., Tokyo, Japan. Pp. 82-93
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, et al, 2008. Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev.* 129(5): 261-70.
- Wang Y, Ito S, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Murata H, et al. 2010. Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 159(1):1-10.
- Ward MM. 2014. Recent Clinical Trials In Lupus Nephritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 40(3): 519–535.

- Yap DYH and La KN. 2015. Pathogenesis of Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus—The Role of Autoantibodies and Lymphocytes Subset Abnormalities. *Int J Mol Sci.* 16(4): 7917–7931.
- Zeisberg M, Kalluri R. 2008. Reversal Of Experimental Renal Fibrosis By BMP-7 Provides Insight Into Novel Therapeutic Strategies For Chronic Kidney Disease. *Pediatr Nephrol* 23:1395-1398.
- Ziyadeh FN, Wolf G. 2008. Pathogenesis of the podocytopathy and albuminuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 4(1):39-45.

Lampiran 1. Ethical Clearance



HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
 RSUD Dr. Moewardi
School of Medicine SebelasMaret University
 Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret



ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 829 / X / HREC /2016

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas
 Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
 Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
 Bahwa usulan penelitian dengan judul


PENGARUH TERAPI N-ASETYL SISTEIN TERHADAP EKSPRESI INTERLEUKIN 17 DAN FIBROSIS INTERSTITIAL PADA MENCIT NEFRITIS LUPUS

Principal investigator : dr.Warigit Dri Atmoko
 Peneliti Utama S961108007

Location Of Research : Lab Histologi, Lab Biomedik dan Patologi Anatomi FK UNS
 Lokasi Tempat Penelitian

Is ethically approved
Dinyatakan laik etik

Issued on : 07 Oktober 2016



Chairman
 Ketua

Dr. Hari Wujoso, dr. Sp.F,MM +
 NIP. 19621022 199503 1 001

Lampiran 2. Analisis Statistik

Case Processing Summary

kelompok		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Ekspresi IL-17	Kontrol	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	Lupus nefritis	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	Lupus nefritis+NAS	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
Fibrosis interstisial	Kontrol	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	Lupus nefritis	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	Lupus nefritis+NAS	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%

Deskripsi IL-17

Kelompok			Statistic	Std. Error
Kontrol	Mean		7.5000	2.31455
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.0270	
		Upper Bound	12.9730	
	5% Trimmed Mean		7.2222	
	Median		7.5000	
	Variance		42.857	
	Std. Deviation		6.54654	
	Minimum		.00	
	Maximum		20.00	
	Range		20.00	
	Interquartile Range		8.75	
	Skewness		.764	.752
	Kurtosis		.875	1.481
Lupus nefritis	Mean		23.7500	4.97763
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11.9798	
		Upper Bound	35.5202	
	5% Trimmed Mean		24.1667	
	Median		25.0000	
	Variance		198.214	
	Std. Deviation		14.07886	
	Minimum		.00	

	Maximum		40.00	
	Range		40.00	
	Interquartile Range		25.00	
	Skewness		-.480	.752
	Kurtosis		-.564	1.481
Lupus nefritis+NAS	Mean		10.6250	2.39745
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.9559	
		Upper Bound	16.2941	
	5% Trimmed Mean		10.6944	
	Median		10.0000	
	Variance		45.982	
	Std. Deviation		6.78101	
	Minimum		.00	
	Maximum		20.00	
	Range		20.00	
	Interquartile Range		11.25	
	Skewness		.165	.752
	Kurtosis		-.166	1.481

Deskripsi Fibrosis interstisial

Kelompok			Statistic	Std. Error
Kontrol	Mean		12.6250	.88515
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	10.5320	
		Upper Bound	14.7180	
	5% Trimmed Mean		12.5833	
	Median		13.0000	
	Variance		6.268	
	Std. Deviation		2.50357	
	Minimum		10.00	
	Maximum		16.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		5.25	
	Skewness		.277	.752
	Kurtosis		-1.392	1.481
Lupus nefritis	Mean		22.2500	2.01556
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	17.4839	
		Upper Bound	27.0161	
	5% Trimmed Mean		22.1667	

	Median	20.0000	
	Variance	32.500	
	Std. Deviation	5.70088	
	Minimum	16.00	
	Maximum	30.00	
	Range	14.00	
	Interquartile Range	12.00	
	Skewness	.474	.752
	Kurtosis	-1.478	1.481
Lupus nefritis+NAS	Mean	15.5000	1.90863
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	10.9868
	Mean	Upper Bound	20.0132
	5% Trimmed Mean	15.2222	
	Median	14.5000	
	Variance	29.143	
	Std. Deviation	5.39841	
	Minimum	10.00	
	Maximum	26.00	
	Range	16.00	
	Interquartile Range	8.25	
	Skewness	1.071	.752
	Kurtosis	.943	1.481

Tests of Normality

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi IL-17	Kontrol	.226	8	.200*	.899	8	.283
	Lupus nefritis	.171	8	.200*	.934	8	.557
	Lupus nefritis+NAS	.287	8	.052	.882	8	.195
Fibrosis interstisial	Kontrol	.228	8	.200*	.835	8	.067
	Lupus nefritis	.278	8	.068	.855	8	.108
	Lupus nefritis+NAS	.213	8	.200*	.899	8	.280

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi IL-17	3.707	2	21	.042
Fibrosis interstisial	2.750	2	21	.087

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Ekspresi IL-17	Kontrol	Lupus nefritis	-16.2500 [*]	4.89092	0.010	-28.9730	-3.5270
		Lupus nefritis+NAS	-3.12500	4.89092	1.000	-15.8480	9.5980
	Lupus nefritis	Kontrol	16.2500 [*]	4.89092	.010	3.5270	28.9730
		Lupus nefritis+NAS	13.12500 [*]	4.89092	0.042	.4020	25.8480
	Lupus nefritis+NAS	Kontrol	3.12500	4.89092	1.000	-9.5980	15.8480
		Lupus nefritis	-13.12500 [*]	4.89092	.042	-25.8480	-.4020
Fibrosis interstisial	Kontrol	Lupus nefritis	-9.62500 [*]	2.37891	0.002	-15.8134	-3.4366
		Lupus nefritis+NAS	-2.87500	2.37891	.721	-9.0634	3.3134
	Lupus nefritis	Kontrol	9.62500 [*]	2.37891	.002	3.4366	15.8134
		Lupus nefritis+NAS	6.75000 [*]	2.37891	0.030	.5616	12.9384
	Lupus nefritis+NAS	Kontrol	2.87500	2.37891	.721	-3.3134	9.0634
		Lupus nefritis	-6.75000 [*]	2.37891	.030	-12.9384	-.5616

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.